

A. RICHIEDENTE (II)

1. Denominazione: **LABORATORIO MICROBIOLOGICO GRANA PROVOLONE S.r.L.**
 Residenza: **NOVARA**

01197390030

NG
SR

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome: **Dr. Tiziana SANTORO**

denominazione studio di appartenenza: **MARIETTI, GISLON e TRUPIANO S.r.l.**

via: **Larga 16 Milano**

cap: **20122**

(prov): **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario //

via: //

D. TITOLO

classe procedura (sez. VI) // gruppo-sottogruppo //

"Metodo per eliminare e/o ridurre i difetti da fermentazione butirrica e propionica nei formaggi e formaggi ottenuti con tale metodo"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA // / //

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **MOGNA, Giovanni**

3) **STROZZI, Gian Paolo**

2) **ALLOISIO, Vito**

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di attività

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIoglimento RISERVE
Data N° Protocollo

1)

2)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc 1) 2) ☐ PROV a pag 35

Doc 2) 0) ☐ PROV a tav

Doc 3) 1) ☐ RIS

Doc 4) 0) ☐ RIS

Doc 5) 0) ☐ RIS

Doc 6) 0) ☐ RIS

Doc 7) 0)

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio, 1 esemplare)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

~~XXXXXX~~ procedura e riferimento procedura generale **DIC. SOST.**

designazione invento

documenti distribuiti con bandiere in Italia

autenticazioni o atto di cessione

nomine complete del richiedente

SCIoglimento RISERVE
Data N° Protocollo

contenuto singole priorità

R) attestati di versamento totale lire

CINQUECENTOESSANTACINQUEMILA=

obbligatorio

COMPILATO IL **22/10/2001**

FIRMA DEL(II) RICHIEDENTE(II)

Dr. Tiziana Santoro

CONTINUA SI/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SI

CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANO

MILANO MI2001A 002202

VERBALE DI DEPOSITO

DUEMILAUNO

VENTIDUE

OTTOBRE

00

15

BEST AVAILABLE COPY

87

87

NUMERO DOMANDA

MI 2001/H002202

REG A

DATA DI DEPOSITO

22/10/2001

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

11/11/2001

D. TITOLO

"Metodo per eliminare e/o ridurre i difetti da fermentazione butirrica e propionica nei formaggi e formaggi ottenuti con tale metodo"

L. RIASSUNTO

L'invenzione concerne un metodo per evitare e/o ridurre il gonfiore butirrico e/o la fermentazione propionica causati da clostridi e batteri propionici nei formaggi, in particolare nei formaggi a media e lunga stagionatura, che comprende effettuare il trattamento dell'essenza foraggiera destinata all'alimentazione delle bovine da latte con una sospensione di colture riattivate di lattobacilli eterofermentanti facoltativi in un mezzo colturale acquoso oppure alternativamente o meglio sequenzialmente, nel processo di preparazione del formaggio, aumentare la temperatura di cottura della cagliata utilizzando al contempo sieroinnesti naturali sottoposti a induzione termica.

M. DISEGNO

BEST AVAILABLE COPY

Descrizione dell'invenzione che ha per titolo:

"Metodo per eliminare e/o ridurre i difetti da fermentazione butirrica e propionica nei formaggi e formaggi ottenuti con tale metodo".

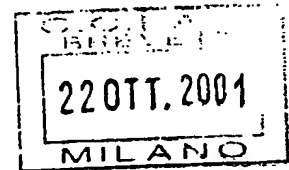
A nome LABORATORIO MICROBIOLOGICO GRANA PROVOLONE S.r.l.,

di nazionalità italiana, con sede in NOVARA

Inventori: - MOGNA, Giovanni

- ALLOISIO, Vito

- STROZZI, Gian Paolo



MI 2001A002202

La presente invenzione è relativa all'inibizione dell'attività dei clostridi e dei batteri propionici nei formaggi, in particolare nei formaggi a media e lunga stagionatura, mediante una strategia che interessa tutta la filiera agrozootecnica e l'industria di trasformazione casearia.

In particolare l'invenzione concerne un metodo per evitare e/o ridurre il gonfiore butirrico e/o la fermentazione propionica causati dai clostridi e dai batteri propionici nei formaggi a media e lunga stagionatura mediante specifici trattamenti attuati all'interno del processo di produzione del formaggio mirati alla decontaminazione dai clostridi, già a partire dal trattamento degli insilati foraggieri destinati all'alimentazione delle bovine da latte.

I *Clostridi* sono germi GRAM positivi, formanti spore e per tale motivo altamente termoresistenti, anaerobi con metabolismo fermentativo che porta alla produzione di grandi quantità di gas (CO_2 e H_2) ed altri prodotti secondari, come acido butirrico, acetico, etanolo, butanolo, isopropanolo, acetone; essi sono in grado inoltre di portare alla decomposizione anaerobica delle proteine. Si riscontrano, come habitat primario, nel terreno e nelle acque ed a seguito di contaminazione anche negli insilati foraggieri, negli alimenti per il bestiame ed in molti prodotti destinati alla alimentazione umana, quali i vegetali, la carne, il latte ed i prodotti caseari, quelli ittici e dolciari.

Alcune specie di clostridi, soprattutto quelli del gruppo II a forte attività proteolitica e saccarolitica, sono patogeni per l'uomo. Citiamo a titolo illustrativo *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*, *Cl. tetani* e *Cl. septicum* che producono esotossine, sostanze proteiche altamente tossiche, in grado di determinare gravi malattie come il botulismo, la gangrena gassosa, il tetano e forme di tossinfezioni alimentari.

Altre specie, appartenenti ad aggregati fisiologici diversi dal gruppo II, come ad esempio *Cl. butyricum*, *Cl. tyrobutyricum* e *Cl. sporogenes* sono invece in grado di determinare gravi difetti in molteplici prodotti alimentari, con particolare riferimento ai prodotti caseari, per la capacità di fermentare anche l'acido lattico prodotto dai batteri lattici durante il loro sviluppo nella cagliata e successivamente nella pasta del formaggio, provocando il cosiddetto "gonfiore tardivo".

I batteri propionici, qui di seguito a volte sono "propionici", sono germi bastoncellari GRAM-positivi, non mobili e senza spore che realizzano la fermentazione propionica a partire da glucosio con formazione di acido propionico, acido acetico, quantità minori di altri acidi ed anidride carbonica.

La specie *Propionibacterium freudenreichii* è in grado di utilizzare anche l'acido lattico con la formazione degli stessi cataboliti.

Quattro specie sono di interesse caseario e se presenti nel latte in numero elevato possono provocare nei primi mesi di stagionatura indesiderata occhiatura diffusa nelle forme di formaggio a media e lunga stagionatura, con gravi danni economici.

I formaggi più esposti al rischio di gonfiore sono quelli a media e lunga stagionatura per le particolari condizioni chimico-fisiche che si instaurano all'interno delle forme. Le spore di *Clostridium* presenti nel latte trovano nella cagliata e successivamente nel formaggio condizioni favorevoli alla loro germinazione e sviluppo, producendo grandi quantità di gas (idrogeno ed anidride carbonica) con conseguente gonfiore delle forme e difetti nella struttura della pasta per la presenza di occhiatura irregolare, sfogliatura accentuata, aspetto spugnoso e fessurazioni. Talvolta

le occhiature sono di dimensioni tali da determinare il rigonfiamento della forma stessa e nei casi più gravi si arriva ad una vera e propria spaccatura.

Sebbene minime quantità di acido butirrico e propionico possano essere desiderate per conferire al formaggio il particolare caratteristico aroma, la formazione di una quantità eccessiva di acido butirrico e propionico determina l'impossibilità di mettere in commercio le forme difettose per aspetto, gusto ed odore sgradevoli.

Un forte incremento del fenomeno del gonfiore nei formaggi a media e lunga stagionatura è stato riscontrato negli ultimi decenni per l'aumentata contaminazione del latte da parte dei clostridi e dei propionici provocata dal crescente impiego di foraggi "insilati", soprattutto di mais ceroso, nell'alimentazione delle bovine da latte.

Gli insilati risultano portatori di molti germi butirrici e propionici come conseguenza di una contaminazione con terra che si verifica al momento dell'insilamento dell'essenza foraggiera.

L'entità della contaminazione con la terra e l'instaurarsi di particolari condizioni all'interno di una massa insilata con modalità non corrette fa sì che molti foraggi insilati, al momento della loro utilizzazione, risultano inquinati da un alto numero di spore (sino a 10^6 per grammo).

La contaminazione dell'habitat agro-zootecnico si aggrava poi ulteriormente per l'ingestione da parte delle bovine delle spore contenute nell'insilato che, passando intatte nel rumine, hanno la possibilità di germinare ed aumentare di numero nell'intestino, per poi passare nelle feci ed essere distribuite nella lettiera.

L'inquinamento del latte con spore di clostridi inizia già al contatto con la mammella, per una scarsa igiene della stessa, e si aggrava successivamente per il contatto con attrezzature sporche di terra, feci e/o insilati fino a raggiungere valori di 10^4 ed oltre per litro di latte.

E' opportuno ricordare che nei formaggi a media e lunga stagionatura è sufficiente un numero molto basso di *Clostridium* per litro di latte (circa 40 microorganismi per litro) per determinare condizioni di rischio gonfiore tardivo. Infatti nella maggior parte di questi formaggi la

pasta rimane dolce (il pH non scende mai al di sotto di 4,90) ed il valore del potenziale redox è sicuramente favorevole alla germinazione delle spore ed alla loro moltiplicazione.

Tra i germi sporigeni presenti il più pericoloso per le fermentazioni nei formaggi è il *Clostridium tyrobutyricum*, perché in grado di utilizzare per la propria crescita, durante tutto il periodo di stagionatura del formaggio, l'acido lattico prodotto dai batteri lattici utilizzati nella caseificazione.

Il *Clostridium tyrobutyricum* è capace di crescere sino a pH 4,65 e neppure alcuni fattori tecnologici che la tradizione casearia ha affinato nel tempo per contrastare il fenomeno, quali il raggiungimento di un basso contenuto di umidità ed una alta concentrazione di cloruro di sodio nella pasta, danno garanzie sufficienti ad evitare la fermentazione butirrica.

Attualmente la difficoltà a contenere lo sviluppo dei clostridi è resa ancor maggiore per via delle peggiorate qualità chimico-fisiche del latte che determinano coaguli più fiacchi e quindi spurghi incompleti.

In tutti i Paesi dove esistono produzioni casearie soggette a gonfiore (Grana Padano, Provolone, Parmigiano Reggiano, Asiago, Montasio, Emmentaler, Gruyère, Cheddar, Sbrinz, Feta, Mimolette, Saint Paulin, Gouda) il danno per i produttori è assai rilevante e per tale motivo sono state elaborate diverse strategie atte ad evitare o almeno a contrastare lo sviluppo dei germi butirrici e propionici.

I mezzi di lotta al gonfiore possono essere divisi in due categorie principali: la prima si basa su tecniche atte a ridurre il numero di spore e propionici nel latte da caseificare, la seconda cerca invece di bloccare lo sviluppo nella pasta del formaggio mediante l'uso di additivi chimici.

Tra le tecniche tradizionali in uso per ridurre il numero di spore già presenti nel latte, citiamo l'affioramento del latte stesso in bacinella che consiste nel distribuire e far sostare per più ore il latte in recipienti di altezza di 20-30 cm alla temperatura di 10-16 °C; in tal modo i globuli di grasso si aggregano, salgono in superficie formando la crema e trascinano con sé gran parte dei

batteri e delle spore di clostridi.

Una tecnica sostitutiva più moderna consiste nel sottoporre a centrifugazione il latte da caseificare. Le spore, caratterizzate da densità maggiore del latte (1,2 contro 1,03), per effetto della forza centrifuga tendono ad accumularsi nella parte pesante che viene separata dalla frazione leggera.

Negli ultimi anni è stata introdotta un'altra tecnologia ugualmente idonea alla riduzione del numero di spore, la microfiltrazione. Tale tecnica consiste nel far passare il latte attraverso membrane di materiali diversi (es. ceramica, polisulfone ecc.) caratterizzati da una porosità tale da permettere il passaggio delle componenti proteiche, glucidiche, lipidiche e saline, trattenendo viceversa le particelle, tra queste i clostridi butirrici, con diametro superiore alla porosità della membrana stessa.

La diffusione di queste tecniche di separazione fisico-meccanica è stata ostacolata per i formaggi di origine da norme restrittive che di fatto ne vietano l'utilizzazione perché considerate non conformi agli "usi leali e costanti", mentre per i formaggi comuni ha costituito fattore deterrente l'elevato costo di investimento ed il fatto che, parallelamente alla riduzione della microflora anti-casearia, si verifica anche un abbassamento di quella filo-casearia con conseguente appiattimento delle caratteristiche organolettiche dei prodotti finiti.

Per quel che riguarda il metodo tradizionale di "affioramento in bacinella", è importante segnalare che esso è utilizzabile esclusivamente per i formaggi parzialmente scremati e comunque anche in riferimento ad essi si è dimostrato inadeguato ad evitare il fenomeno del gonfiore quando il tenore di spore e batteri propionici nel latte supera certi limiti.

Per questi motivi la recente legislazione ha consentito l'uso di additivi alimentari in forma di sostanze conservanti e battericide; in particolare per i formaggi sono attualmente previsti i seguenti additivi:

- a) Nitrato di potassio (E 252)

- b) Esametilentetramina (E 239)
- c) Nisina (E 234)
- d) Lisozima (E 1105)

i quali, con differenti meccanismi di azione, sono in grado di inibire e/o contenere lo sviluppo dei clostridi e propionici, almeno quando il loro numero nella cagliata non è eccessivamente elevato.

In generale l'aggiunta di additivi, anche quando consentiti dalle norme vigenti, è da considerarsi fattore negativo sia per la qualità dell'alimento stesso, sia per gli aspetti sanitari indotti alla salute dei consumatori, per i possibili effetti tossicologici, cancerogeni e di impatto sull'ecosistema intestinale.

Il nitrato di potassio, ammesso come residuo massimo fino a 50 mg/Kg per il "Formaggio duro, semiduro e semimolle", è pericoloso per la salute dei consumatori in quanto può essere trasformato in nitrosamina, a sospetta azione cancerogena.

L'esametilentetramina (o "esamina") è un polimero della formaldeide, ammesso dalla legislazione vigente seppure assai discusso, per il formaggio Provolone alla dose massima di 25 mg/Kg di residuo, espressi come formaldeide. Essa viene aggiunta normalmente al momento della filatura della pasta nell'acqua calda utilizzata allo scopo.

La nisina fa parte di un gruppo di sostanze antibatteriche, dette batteriocine, che sono metaboliti secondari di origine microbica e di natura peptidica, definiti anche lantibiotici, attivi contro i germi GRAM positivi ed in particolare quelli sporulanti. Il meccanismo d'azione anticlostridica consiste nel bloccare la germinazione durante la fase di ingrossamento delle spore per disattivazione dei residui sulfidrilici delle fosfolipoproteine di membrana. E' ammessa per i formaggi stagionati fino alla dose massima di 12,5 mg/Kg.

Il lisozima è un enzima di natura proteica (muramidasi) dotato di attività litica nei confronti della struttura mucopolisaccaridica della parete cellulare dei batteri GRAM positivi; in riferimento ai clostridi il suo meccanismo d'azione consiste nel lisare la forma vegetativa non appena questa è

fuoriuscita dalla spora. Il lisozima, per legge consentito in Italia anche per i formaggi D.O.P. Grana Padano, Provolone Valpadana, Asiago e Montasio nel dosaggio "quanto basta", di norma viene aggiunto al latte in caldaia in ragione di 20-25 ppm, cui corrispondono circa 300 ppm nel formaggio, dose considerata sufficiente a garantire un buon controllo del gonfiore tardivo.

In molti Paesi extraeuropei a scarsa tradizione casearia viene utilizzato anche il perossido di idrogeno, cioè la comune acqua ossigenata, capace di distruggere numerose forme vegetative presenti nel latte.

In Italia per molto tempo è stato consentito l'uso della formaldeide nella trasformazione del latte a Grana Padano, usata essenzialmente per l'azione inibente verso i batteri propionici e coliformi e solo marginalmente nei confronti dei germi sporigeni.

E' noto inoltre che tutti gli additivi sopra menzionati non hanno azione selettiva specifica contro i clostridi e propionici, ma esplicano azione batteriostatica e perfino battericida nei confronti di molti gruppi batterici, compresi quelli "filo caseari", la cui presenza e velocità di crescita influenza tutti i fondamentali parametri tecnologici del ciclo produttivo. L'assenza o comunque una rallentata fermentazione lattica si ripercuote negativamente sulle caratteristiche strutturali della cagliata e successivamente del formaggio in fase di maturazione, compromettendo la qualità del prodotto finito e rallentandone la stagionatura.

Scopo della presente invenzione è di evitare e/o ridurre il gonfiore tardivo e la fermentazione propionica nei formaggi, in particolare nei formaggi a media e lunga stagionatura, senza far ricorso all'uso di additivi, potenzialmente pericolosi per la salute del consumatore e comunque causa indiretta di modificazioni strutturali ed organolettiche dei formaggi tipici per le alterazioni da essi indotte sulla composizione della microflora naturale del latte e per la forte inibizione esercitata sulla coltura naturale (o selezionata) utilizzata nella caseificazione.

Il metodo della presente invenzione è particolarmente adatto per la produzione di formaggi quali il Provolone, il Montasio, l'Asiago, il Grana Padano e il Parmigiano Reggiano.

Con il termine "additivi" si intende, secondo l'invenzione, qualsiasi sostanza aggiunta a scopo conservante e/o battericida al latte e/o al formaggio durante le varie fasi di lavorazione.

L'assenza di additivi nei formaggi preparati secondo il metodo dell'invenzione, oltre a evitare gli effetti dannosi di tali sostanze e a preservare la "naturalità" dei formaggi così prodotti, permette di abbreviare i tempi di maturazione e stagionatura, consentendo pertanto di conseguire un importante risultato dal punto di vista economico e commerciale.

L'invenzione concerne così un metodo di lotta biologica idoneo a prevenire la contaminazione del latte da parte dei clostridi responsabili del gonfiore tardivo e dei batteri propionici responsabili della fermentazione propionica nei formaggi, in particolare nei formaggi a media e lunga stagionatura, in assenza di additivi.

Più particolarmente, la presente invenzione concerne un metodo per ridurre e/o evitare la fermentazione butirrica e propionica nei formaggi a media e lunga stagionatura, detto metodo prevedendo alternativamente o sequenzialmente, almeno la messa in opera di due fasi (a) e (b), come definito nelle rivendicazioni 1 e seguenti.

La fase denominata (a) consiste nel trattare, al momento dell'insilamento le essenze foraggiere, destinate all'alimentazione delle bovine da latte con colture liquide di lattobacilli eterofermentanti facoltativi riattivati, in grado di colonizzare immediatamente l'intera massa insilata e di produrre un rapido abbassamento del pH che impedisce ai germi sporigeni e propionici, normalmente presenti nel foraggio trinciato (per la inevitabile contaminazione con terra) di moltiplicarsi e quindi di raggiungere cariche elevate.

Le espressioni "lattobacilli riattivati" o "colture riattivate" significano, secondo la presente invenzione, che i lattobacilli sono perfettamente attivi e vitali, avendo ultimato il loro ciclo biologico riproduttivo in opportuni substrati liquidi poco prima della distribuzione sul foraggio trinciato.

Una prima innovazione rispetto allo stato dell'arte attuale consiste infatti nell'utilizzare

colture microbiche specifiche per le singole essenze foraggiere, ognuna preferibilmente costituita da lattobacilli isolati dalla microflora epifita autoctona della stessa tipologia di vegetale a cui è destinata. Tale specificità garantisce al momento dell'insilamento una immediata colonizzazione da parte dei ceppi inoculati, già perfettamente abituati ad utilizzare le fonti azotate e glucidiche tipiche di quella specifica essenza foraggiera.

Generalmente le colture batteriche per il trattamento degli insilati sono commercializzate ed utilizzate allo stato disidratato, cioè sotto forma di polvere, e pertanto caratterizzate da una fase di latenza molto prolungata che ritarda l'inizio della moltiplicazione cellulare.

E' opportuno a questo proposito ricordare che qualunque cellula vivente sottoposta ad essiccazione, anche con processi di disidratazione particolarmente delicati quali la liofilizzazione, è più o meno sofferente e necessita di un certo periodo di tempo per ripristinare la propria piena efficienza e vitalità. Il prolungamento della fase di latenza si traduce in un ritardo più o meno rilevante nei tempi di colonizzazione del substrato vegetale, consentendo ai germi dannosi di replicarsi e determinare quei fenomeni negativi che la coltura batterica dovrebbe impedire.

Preferibilmente le colture batteriche atte al trattamento degli insilati secondo l'invenzione sono costituite da associazioni microbiche complesse di ceppi di lattobacilli eterofermentanti facoltativi "wild type" (dette anche selvagge o naturali) isolati dalle specifiche essenze vegetali a cui sono destinate ai fini dell'insilamento (mais ceroso, erbai di leguminose come erba medica e trifoglio, erbai di graminacee come loietto, loiessa e triticale) e sono scelte in funzione della caseificazione predominante a cui è destinato il latte proveniente dalle fattorie che effettuano il trattamento dell'insilato.

Secondo un aspetto vantaggioso, i lattobacilli sono scelti nel gruppo che comprende il *Lactobacillus plantarum* e il *Lactobacillus pentosus*.

Secondo un aspetto particolarmente vantaggioso, i lattobacilli sono scelti nel gruppo che comprende i seguenti lattobacilli depositati ai sensi del Trattato di Budapest sul riconoscimento

internazionale del deposito di microorganismi del 28 aprile 1977, presso la BCCM/LMG Bacteria Collection, i Gent - Belgio il giorno 16 ottobre 2001, con i seguenti numeri di accesso:

Lactobacillus pentosus : LMG P-21019

Lactobacillus plantarum : LMG P-21020

Lactobacillus plantarum : LMG P-21021

Lactobacillus plantarum : LMG P-21022

Lactobacillus plantarum : LMG P-21023.

Tali lattobacilli, le cui caratteristiche sono indicate nell'Esempio 2 che segue, sono nuovi e costituiscono un ulteriore oggetto della presente invenzione.

L'uso di tali lattobacilli nel trattamento degli insilati secondo l'invenzione costituisce un altro oggetto della presente invenzione.

Secondo un aspetto preferito della presente invenzione, la fase (a) consiste nell'utilizzare la coltura batterica allo stato liquido, previa "attivazione" da eseguirsi nelle ore immediatamente precedenti le operazioni di allestimento del silo.

Secondo un aspetto preferibile dell'invenzione, tale trattamento può essere condotto con una apposita attrezzatura come descritto nel brevetto italiano n. 1226750 rilasciato il 5 febbraio 1991 dal titolo "Kit per la riattivazione di colture microbiche disidratate, in particolare di batteri".

Il kit di cui al brevetto sopracitato comprende sostanzialmente una tanica sterile in politene, da litri 10, contenente la coltura liofilizzata ed uno specifico substrato colturale anidro che, dopo reidratazione con acqua potabile alla temperatura di 26-30° C, consente una ottimale riattivazione delle cellule batteriche; completa l'attrezzatura un involucro in materiale espanso, diviso in due metà, in grado di racchiudere, dopo ricomposizione delle parti, completamente la tanica e di coibentare quindi alla temperatura desiderata la coltura durante tutta la fase di riattivazione.

Nella formulazione del substrato colturale, oltre agli elementi nutritivi per i lattobacilli,

figura un sistema tampone che, evitando un abbassamento eccessivo del pH, consente di ottenere una popolazione batterica, a fine riattivazione, superiore a $5 \cdot 10^9$ UFC/ml.

Secondo un aspetto vantaggioso dell'invenzione, la sospensione di lattobacilli contiene il sistema tampone fosfato bisodico/fosfato monopotassico.

I lattobacilli così riattivati, sono inoculati nella massa vegetale destinata all'insilamento in ragione di almeno $1 \cdot 10^5$, preferibilmente di almeno $1 \cdot 10^6$, per grammo di massa vegetale e riescono ad instaurare una rapida ed intensa fermentazione lattica in grado di inibire lo sviluppo dei microrganismi dannosi ed assicurare la buona conservazione del foraggio senza perdite apprezzabili di sostanza secca e di energia.

Degli esempi, inseriti a scopo illustrativo e in nessun modo limitativo, di sospensioni adatte al trattamento degli insilati secondo la presente invenzione sono forniti nella parte sperimentale.

I risultati degli esperimenti condotti dalla richiedente e riportati nella parte sperimentale che segue, dimostrano che il latte delle bovine alimentate con un insilato trattato con la Coltura A dotata di elevatissima attività biologica, ha un numero di spore significativamente più basso rispetto al latte prodotto nelle stalle i cui animali sono stati alimentati con insilato "non trattato".

Si comprende facilmente che il miglioramento qualitativo dei foraggi insilati trattati si ripercuote positivamente lungo tutta la filiera che ha nella stalla il suo punto di arrivo, e permette di ridurre in modo significativo la contaminazione da clostridi nel formaggio prodotto utilizzando il latte proveniente da bovine così alimentate.

Alternativamente (o, se desiderato, sequenzialmente) si può ottenere una decisa diminuzione dei clostridi nel formaggio (e di conseguenza una riduzione del gonfiore tardivo da essi provocato) realizzando un processo di trasformazione tecnologica idoneo ad influenzare, e pilotare nel senso desiderato, il ciclo vitale dei clostridi nelle prime 24 ore di vita all'interno della pasta dei formaggi a media e lunga stagionatura. Tale processo (fase (b) dell'invenzione) favorisce, in detto periodo di

tempo, la germinazione della quasi totalità delle spore dei germi butirrici presenti nella cagliata, stimolando il passaggio dalla forma altamente resistente a tutti gli shock chimico-fisici (spora) a quella vegetativa; nello stesso arco di tempo il procedimento oggetto dell'invenzione riesce a distruggere la quasi totalità dei batteri propionici e delle cellule vegetative dei clostridi presenti nella cagliata, attraverso una particolare combinazione di temperatura più elevata e acidità garantita mediante l'uso di siero innesti adattati a vivere e proliferare a tali temperature.

E' importante ai fini della comprensione del metodo oggetto di questo specifico punto dell'invenzione accennare schematicamente al ciclo biologico che caratterizza i germi dotati di endospore quali sono i clostridi.

In particolare questi ultimi (*Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum* e *C. sporogenes*), responsabili del fenomeno del gonfiore nei formaggi a media e lunga stagionatura, sono in grado di formare endospore subterminali, ovali o rotonde, di dimensioni comprese tra 2,4 – 3,0 μm x 1,0-1,3 μm .

Essenzialmente il loro ciclo vitale è caratterizzato da due stati biologici:

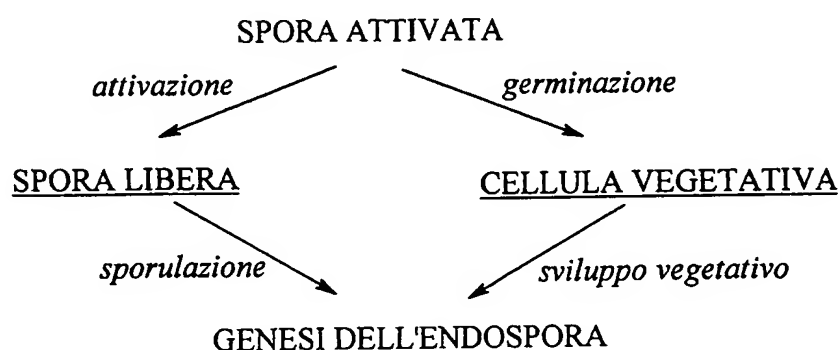
1. Lo stato di spora, in cui la cellula rivestita da una parete molto resistente agli agenti chimico-fisici è in una condizione di forte disidratazione con metabolismo praticamente nullo. Può rimanere in tale stato dormiente per periodi di tempo molto lunghi in attesa che si stabiliscano condizioni idonee al proprio sviluppo.

2. Lo stato di cellula vegetativa, che rappresenta la fase vitale del ciclo durante il quale le cellule in piena attività metabolica si replicano per scissione binaria e producono a partire da carboidrati, acidi organici (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*) e proteine (*C. sporogenes*) acido butirrico, acetico, vari alcoli, anidride carbonica ed idrogeno.

Per passare da uno stato all'altro i clostridi attraversano fasi diverse, tutte favorite od ostacolate dalle particolari condizioni ambientali in cui le cellule si vengono a trovare, come ad esempio il valore dell'acqua libera disponibile (A_w), la composizione del substrato, la temperatura,

le condizioni di anaerobiosi, il potenziale ossido-riduttivo ed il valore del pH:

L'approfondimento del ciclo vitale dei clostridi *in vitro* con prove di laboratorio e nella cagliata dei formaggi a media e lunga stagionatura, ha costituito la premessa scientifica che sta alla base delle innovazioni tecnologiche introdotte con la presente invenzione



Le sperimentazioni attuate sono servite a capire come mai, a fronte anche di latte con livelli di contaminazione contenuta relativamente al numero di spore e di forme vegetative di clostridi, quasi tutte le forme di formaggi a pasta a lunga e media stagionatura siano destinate a presentare il difetto di gonfiore tardivo nel corso della stagionatura.

Numerose prove di laboratorio sono state condotte in latte affiorato destinato alla produzione di formaggio a lunga e media stagionatura, dopo contaminazione artificiale dello stesso con insilato di mais contenente un numero noto di spore butirriche.

Una parte della ricerca è stata inoltre mirata alla conoscenza della percentuale di germinazione delle spore, il tempo di generazione delle cellule vegetative e l'abbattimento delle stesse determinato dalle particolari condizioni chimico-fisiche che si realizzano al variare della temperatura di cottura della cagliata e dell'acidità della pasta del formaggio.

Alla luce dei dati citati e delle sperimentazioni di caseificazione effettuate su formaggi a media e lunga stagionatura, riportate nella parte sperimentale che segue, è emerso che la temperatura ottimale di cottura deve essere aumentata di 2-4°C rispetto alla norma, in funzione della qualità del latte e della termofilia dell'innesco da utilizzarsi in caseificazione.

La possibilità di effettuare una cottura della cagliata a temperature più elevate rispetto alla prassi comune, senza compromettere l'acidificazione, deriva dalle peculiari caratteristiche tecnologiche della coltura batterica del sieroinnesto, il quale deve essere in grado di attuare una rapida ed intensa fermentazione lattica anche ad una temperatura di 2-4°C superiore a quella normalmente utilizzata, garantendo un valore del pH, durante tutto il ciclo di lavorazione, uguale od addirittura minore rispetto a quello che si riscontra in una cagliata ottenuta con i soliti parametri tecnologici.

La proprietà della coltura di replicarsi normalmente a temperature così elevate viene indotta tramite una serie di passaggi (subcolture) a temperatura gradualmente sempre più elevata, in modo tale da selezionare all'interno della complessità microbica della coltura quei ceppi di lattobacilli più predisposti a crescere in queste particolari condizioni colturali.

Questo specifico aspetto dell'invenzione sfrutta in pratica la caratteristica comune a tutte le colture batteriche naturali di grande variabilità genetica complessiva per la presenza nell'associazione batterica di una molteplicità di biotipi e varietà, in grado quindi di rispondere, anche in tempi relativamente brevi, a modificazioni delle condizioni colturali.

In particolare le colture naturali di batteri lattici utilizzate per la caseificazione della maggior parte dei formaggi a media e lunga stagionatura, sono costituite da associazioni molto complesse che si sviluppano spontaneamente nel siero residuo di caseificazione del giorno precedente e per questo sono definite "sieroinnesti naturali", caratterizzati da un forte sinergismo che si instaura tra i biotipi di lattobacilli presenti.

Le condizioni colturali sperimentate relativamente a questo punto importante della strategia anticlostridica oggetto della presente invenzione, consistono nell'incubare i sieri residui di lavorazione, prelevati presso i caseifici, secondo un determinato ciclo termico, automaticamente controllato, che inizia con una temperatura inferiore di 2 °C rispetto a quella di cottura rilevata in caseificio e che termina, con andamento discendente in gradiente termico di circa 1,5 °C all'ora,

alla temperatura di circa 20 °C riscontrabile a fine di una incubazione di circa 20 ore. La coltura viene a questo punto sottoposta a raffreddamento rapido mediante circolazione nell'intercapedine della fermentiera di acqua gelida a 4-5 °C.

Il metodo per realizzare l'induzione termica prevista dalla presente invenzione, prevede che ogni giorno viene effettuata una subcoltura, iniziando il ciclo termico ad una temperatura superiore di 0,3 °C rispetto a quella utilizzata il giorno precedente. Nelle prime ore di incubazione di ogni trapianto i biotipi di lattobacilli più termofili iniziano a replicarsi più velocemente di quelli meno termofili aumentando di numero ad ogni passaggio fino a determinare una popolazione significativamente importante, ma mai esclusiva per la possibilità delle varietà meno termofile di svilupparsi quando la temperatura comincia a scendere.

Nel giro di 10-15 giorni normalmente la coltura che si genera è dotata di una attività fermentativa a temperatura elevata simile a quella posseduta dalla stessa coltura se sviluppata a temperatura normale.

Per ottenere tale risultato è indispensabile conoscere la dinamica di sviluppo della popolazione batterica nel suo complesso, evitando di stressare la coltura con tempi di incubazione troppo lunghi o condizioni colturali tali da indurre mortalità o comunque sofferenza alle varie specie di lattobacilli. E' di fondamentale importanza studiare i tempi di replica delle diverse specie batteriche al variare delle condizioni colturali, in modo tale da bloccare la replicazione quando la popolazione è ancora in fase di crescita esponenziale, prima cioè dell'accumulo dei cataboliti prodotti dagli stessi batteri. Tra questi il più devastante per le cellule batteriche è sicuramente l'acido lattico che, quando supera determinate concentrazioni nel mezzo colturale, diventa molto tossico e porta prima a sofferenza e successivamente a morte la cellula batterica.

In merito alla capacità di moltiplicarsi a temperature più elevate di 2-4°C rispetto a quelle normalmente utilizzate in caseificio, abbiamo potuto constatare che tutte le specie di lattobacilli "wild type" (*L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. casei*)

componenti le colture naturali per formaggi a media e lunga stagionatura, mostrano questa capacità di adattamento.

In particolare la specie *L. helveticus* mostra una attitudine leggermente superiore alle altre tipologie, ma in ogni caso alla fine del trattamento di induzione termica la popolazione batterica è comunque costituita dalle stesse specie batteriche inizialmente presenti nella coltura ed in rapporti numerici molto simili.

L'uso di sieroinnesti naturali sottoposti a induzione termica per effettuare caseificazioni senza l'uso di additivi costituisce un ulteriore aspetto dell'invenzione.

Il metodo dell'invenzione, che comprende di effettuare almeno alternativamente o, in modo vantaggioso, sequenzialmente, le fasi (a) e (b) qui descritte e rivendicate, è in grado quindi di fornire dei formaggi a media e lunga stagionatura che presentano una ridotta fermentazione butirrica e propionica e di conseguenza una diminuzione del gonfiore tardivo e precoce.

Tale sorprendente effetto è mostrato in dettaglio nella parte sperimentale che segue dove vengono riportati anche i risultati finali di esperimenti di caseificazione condotti secondo i metodi tradizionali e secondo il metodo dell'invenzione. In particolare i risultati riportati nell'Esempio 5 mostrano chiaramente che il trattamento dell'invenzione, in particolare l'adozione della fase (b) che utilizza la Coltura A (descritta nell'Esempio 2) fornisce risultati equiparabili se non migliori a quelli ottenibili con l'uso di additivi.

Secondo un ulteriore aspetto preferito dell'invenzione, è possibile condurre un trattamento finale destinato alla inibizione della crescita e dell'attività dei clostridi nella forma di formaggio, considerata dopo le prime 24 ore dalla sua produzione; tale trattamento è di natura fisica ed è in grado di evitare e/o ridurre le fermentazioni butirrica e propionica.

Detto trattamento consiste essenzialmente nel raffreddare la forma di formaggio dopo la formatura, per immersione in acqua alla temperatura non superiore a 9 °C, preferibilmente tra 3 e 7°C, fino a che la temperatura nel cuore della forma scende ad un valore inferiore o pari a 10-12°C.

In funzione della massa delle forme dei vari formaggi il raffreddamento può essere condotto in maniera dinamica ovvero statica. Sempre a seconda delle dimensioni, si possono raggiungere temperature nel cuore della forma di 10°C o inferiori per le pezzature più piccole e temperature di poco più elevate per le pezzature più grandi.

Questo trattamento è in particolare applicabile con successo ai formaggi a pasta filata, quali le Provole ed il Provolone, per la cui produzione lo stato dell'arte prevede attualmente l'uso di esametilentetramina per contrastare il gonfiore.

Lo scopo che si raggiunge con il raffreddamento precoce delle forme di formaggio consiste nell'impedire alle cellule vegetative dei clostridi eventualmente sopravvissute alle condizioni avverse indotte dai trattamenti delle fasi (a) e/o (b) secondo l'invenzione, di svilupparsi e produrre gas ed alle spore degli stessi, eventualmente ancora presenti in tale stato nella forma del formaggio, di germinare ed in tal modo di generare nuove cellule vegetative. Con questo trattamento anche la fermentazione propionica viene del tutto inibita o comunque notevolmente ridotta.

L'ottimizzazione del presente aspetto dell'invenzione è stata resa possibile dall'approfondimento *in vitro* del ciclo vitale dei clostridi, attraverso sperimentazioni che hanno consentito di conoscere:

- la temperatura al di sotto della quale le spore non riescono più a germinare
- il tempo di replica delle forme vegetative a diverse temperature

Relativamente al primo punto, valutato a pH 5,3 che rappresenta la condizione simile a quella che si riscontra nella maggior parte dei formaggi a pasta cotta, semicotta e filata nelle prime 12 - 24 ore, la richiedente ha potuto constatare che al di sotto di 8 - 9° C, in funzione delle specie di clostridi, non si ha germinazione delle spore.

Al di sotto di tale temperatura si riesce cioè a bloccare il ciclo vegetativo dei clostridi, mantenendo la forma di resistenza sporale in uno stato quiescente e quindi tale da non creare danni.

In altre parole le spore che dovessero residuare come tali nella pasta del formaggio a fine caseificazione, nonostante l'azione stimolante la germinazione attuata nel trattamento della fase (b) della presente invenzione, non hanno la possibilità di proliferare quando la temperatura della pasta del formaggio è inferiore a 9° C, preferibilmente a una temperatura di 7-8°C.

Un secondo e fondamentale elemento di conoscenza riguarda il tempo di replica delle cellule vegetative alle diverse temperature, perché in funzione della durata di una scissione binaria dipende logicamente la velocità di proliferazione e quindi il numero di clostridi che si possono formare in un certo tempo.

Relativamente a questo punto, valutato sempre a pH di 5,3 per le ragioni sopra citate, abbiamo potuto constatare che la temperatura ottimale di sviluppo, cioè quella in cui il tempo di replica è più breve, è di circa 24° C, a differenza della temperatura di 37° C riportata in letteratura.

Si illustrano i dati riscontrati nelle sperimentazioni condotte in laboratorio che hanno permesso di appurare questo parametro indispensabile per condurre una lotta biologica adeguata alla fermentazione butirrica e propionica come mostrato nella Tabella seguente:

Temperatura di incubazione di un latte acidificato a pH 5,3 contaminato al tempo zero da n. 2.500 spore di clostridi butirrici per litro	Tempo medio di replica	Numero di cellule vegetative per litro che si producono in 48 ore di incubazione
6° C	-	-
8° C	non determinabile	~ 100
10° C	~ 13,0 ore	~ 14.000
15° C	~ 7,8 ore	~ 175.000
24° C	~ 3,1 ore	~ 200.000.000
30° C	~ 4,8 ore	~ 16.000.000
37° C	~ 7,7 ore	~ 150.000
44° C	-	-

Tali dati, associati alla conoscenza della curva di decadimento termico che si verifica all'interno delle forme di formaggio nelle prime 48 ore di vita, consentono di mettere a punto un raffreddamento delle forme stesse con tempi e modalità tali da abbreviare al massimo la permanenza alle temperature più a rischio, evitando in tal modo l'aumento della popolazione clostridica.

Gli esempi che sono forniti nella Parte Sperimentale che segue illustrano in dettaglio l'invenzione senza volerla limitare in alcun modo.

PARTE SPERIMENTALE

ESEMPIO 1

FORMULAZIONE DEL SUBSTRATO COLTURALE

Una formulazione del substrato colturale, inserito nella tanica ed idoneo per preparare 10 litri di

coltura riattivata dell'Esempio 2 che segue, destinata al trattamento di 500 quintali di insilato, è la seguente:

- Peptone vegetale	g	80
- Peptone di soia	g	40
- Destrosio	g	500
- Estratto di lievito	g	30
- Glutammato monosodico	g	100
- Fosfato bisodico anidro	g	11,46
- Fosfato monopotassico	g	79,75
- Manganese solfato	g	2,50

ESEMPIO 2

INIBIZIONE DEI CLOSTRIDI NEGLI INSILATI DI MAIS CEROSO CON UNA COLTURA BATTERICA COSTITUITA DA CEPPI "WILD TYPE" DI *LACTOBACILLUS PLANTARUM* E *LACTOBACILLUS PENTOSUS*.

In riferimento al mais ceroso, il vegetale più insilato e maggiormente utilizzato nell'alimentazione delle bovine da latte, i risultati migliori sono stati raggiunti utilizzando una coltura batterica complessa, qui di seguito denominata qui di seguito "Coltura A", costituita da quattro diversi biotipi di *Lactobacillus plantarum* e da un ceppo di *Lactobacillus pentosus*, depositati presso la BCCM/LMG Bacteria Collection in Belgio, il 16 ottobre 2001 con i seguenti numeri di accesso: LMG P-21019, LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022, LMG P-21023.

I ceppi suddetti presentano le seguenti caratteristiche comuni:

- bastoncini gram-positivi isolati e/o in corti catene
- eterofermentanti facoltativi
- nessuna crescita a 45° C.
- incapacità a produrre ammoniaca da arginina

Essi sono inoltre caratterizzati per la capacità di fermentare i seguenti carboidrati come riportato nella Tabella I:

Tabella I

		<i>L. plantarum</i> LMG P-21021	<i>L. plantarum</i> LMG P-21020	<i>L. plantarum</i> LMG P-21023	<i>L. plantarum</i> LMG P-21022	<i>L. pentosus</i> LMG P-21019
1	Glicerolo					+
2	Eritritolo					
3	D-Arabinosio					
4	L-Arabinosio	+	+		+	+
5	Ribosio	+	+	+	+	+
6	D-Xilosio					+
7	L-Xilosio					
8	Adonitolo					
9	β Metil-xiloside					
10	Galattosio	+	+	+	+	+
11	D-Glucosio	+	+	+	+	+
12	D-Fruttosio	+	+	+	+	+
13	D-Mannosio	+	+	+	+	+
14	L-Sorbose					
15	Ramnosio		+	+		+
16	Dulcitolo					+
17	Inositolo					
18	Mannitolo	+	+	+	+	+
19	Sorbitolo	+	+	+	+	+

20	α Metil -D-mannoside	+	+	+	+	
21	α Metil -D-glucoside					+
22	N Acetil glucosamina	+	+	+	+	+
23	Amigdalina	+	+	+	+	+
24	Arbutina	+	+	+	+	+
25	Esculina	+	+	+	+	+
26	Salicina	+	+	+	+	+
27	Cellobiosio	+	+	+	+	+
28	Maltosio	+	+	+	+	+
29	Lattosio	+	+	+	+	+
30	Melibiosio	+	+	+	+	+
31	Saccarosio	+	+	+	+	+
32	Trealosio	+	+	+	+	+
33	Inulina					
34	Melezitosio	+	+	+	+	+
35	D-Raffinosio	+	+	+	+	+
36	Amido					
37	Glicogeno					
38	Xilitolo					
39	β -Gentobiosio	+	+	+	+	+
40	D-Turanosio	+	+	+		
41	D-Lixosio					
42	D-Tagatosio					
43	D-Fucosio					

44	L-Fucosio					
45	D-Arabitolo					
46	L-Arabitolo					
47	Gluconato	+	+	+	+	
48	2 cheto-gluconato					
49	5 cheto-gluconato					

Detti 5 ceppi di lattobacilli, isolati da granoturco, se fatti crescere in succo di mais (ottenuto per triturazione di 0,5 Kg di vegetale, raccolto in piena maturazione cerosa, in 1 litro di acqua distillata, successiva filtrazione grossolana, aggiustamento del pH a 5,70 e sterilizzazione a 121° C per 15 minuti primi) sono in grado di produrre in 24 ore, alla temperatura di 28 °C e con un inoculo dell'1%, le quantità di acido lattico ed acetico indicate nella Tabella II:

Tabella II

	Ac. lattico totale (g/litro)	Ac. lattico Isomero D %	Ac. lattico Isomero L %	Ac. acetico (g/litro)	pH alle 24 ore
<i>L. plantarum</i> LMG P-21021	6,56	63	37	0,15	3,51
<i>L. plantarum</i> LMG P-21020	5,18	83	17	0,14	3,50
<i>L. plantarum</i> LMG P-21023	5,20	85	15	0,29	3,47
<i>L. plantarum</i> LMG P-21022	5,83	68	32	0,19	3,58
<i>L. pentosus</i> LMG P-21019	6,85	61	39	0,12	3,46

Sperimentazioni hanno evidenziato che il trattamento del mais trinciato ceroso con la Coltura A di lattobacilli riattivati garantisce un rapido abbassamento del pH (media 3,65) che stabilizza biologicamente il silo e determina, oltre ad un miglioramento di tutti i parametri chimico-fisici e nutrizionali, anche una netta azione di inibizione nei confronti dei clostridi e dei batteri

propionici.

Le analisi condotte su trinciato trattato con la Coltura A, attivata allo stato liquido secondo l'invenzione, in parallelo sempre con sili non trattati e/o trattati con colture aspecifiche di lattobacilli in forma liofilizzata, hanno evidenziato i risultati indicati nella Tabella III:

Tabella III

<i>Determinazioni analitiche</i>	Insilati "trattati" con Coltura A	Insilati "trattati" con colture liofilizzate aspecifiche di lattobacilli	Insilati non "trattati"
Aspetto	eccellente	buono	variabile
Appetibilità	eccellente	discreta	variabile
Temperatura interna (°C)	18,9	25,5	30,3
Sostanza secca in %	32,7	31,4	29,6
pH al desilamento	3,69	4,18	4,27
Unità Foraggiere per quintale	27,4	24,6	22,5
Concentrazione energetica (U.F./ Kg s.s.)	0,84	0,78	0,76
Percentuale di azoto ammoniacale sull'azoto totale	4,07	4,83	7,17
acido lattico	4,46	3,58	3,06

Acidi grassi in % della s.s.	acido acetico	1,83	1,73	3,41
	acido propionico	0,11	0,19	0,26
	acido butirrico	tracce	0,11	0,27

Relativamente alla distribuzione del numero di spore di clostridi, la Tabella IV seguente riassume i valori medi riscontrati:

Tabella IV

Numero di spore per grammo	Insilati "trattati" Con Coltura A	Insilati "trattati" con colture liofilizzate aspecifiche di lattobacilli	Insilati non "trattati"
meno di 100	80 %	-	-
da 101 a 1.000	20 %	70 %	25 %
da 1.001 a 10.000	-	30 %	55 %
oltre 10.000	-	-	20 %

I dati delle tabelle evidenziano un netto miglioramento qualitativo relativamente alle proprietà nutrizionali e al numero di sporigeni butirrici e batteri propionici degli insilati di mais "trattati" con la Coltura A attivata allo stato liquido.

I risultati sorprendenti riscontrati negli insilati si sono direttamente ripercossi sullo stato sanitario di bovine in lattazione alimentate con tali insilati.

Dopo aver somministrato le due tipologie di insilati per un consistente periodo di tempo (circa 30-40 giorni) negli animali alimentati con il trinciato "trattato" si è notato un miglioramento dello stato funzionale della mammella, dimostrato soprattutto da una sensibile diminuzione dei quarti con disordini secretori.

Analisi condotte su campionature di latti di massa hanno evidenziato, relativamente al numero di spore di clostridi nel latte, i dati sotto riportati nella Tabella V espressi in gruppi di classi

di merito con le rispettive percentuali:

Tabella V

Numero di spore di clostridi butirrici per litro di latte (MPN / l)	Latte proveniente da fattorie in cui le bovine sono state alimentate con insilati "trattati" con Coltura A	Latte proveniente da fattorie in cui le bovine sono state alimentate con insilati "non trattati"
meno di 250	70 %	-
da 251 a 750	20 %	40 %
da 751 a 2.500	10 %	30 %
oltre 2.500	-	30 %

ESEMPIO 3

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DELLA COMBINAZIONE TEMPERATURA-ACIDITA' SUI CLOSTRIDI E PROPIONICI NELLA PREPARAZIONE DEL FORMAGGIO PROVOLONE

Si è simulato il ciclo termico che caratterizza la pasta del Provolone; i campioni di latte sono stati per metà acidificati con il sieroinnesto di lavorazione e per l'altra metà non inoculati; sono stati poi incubati per 7 ore alle temperature di 52-54 °C, scelte dopo aver constatato che la temperatura media di cottura utilizzata per questo formaggio è di circa 50 °C.

L'incubazione degli stessi campioni è stata poi proseguita con un gradiente termico discendente di 1° C all'ora, per un tempo complessivo di 48 ore.

Prelievi effettuati al tempo zero (corrispondente al momento di fine scarico della cagliata nella vasca drenante), dopo 2 ore (tempo corrispondente a 2 ore di maturazione della pasta) ed a 4 ore (tempo corrispondente all'inizio della filatura della pasta) sono stati sottoposti con grande accuratezza alla determinazione del numero delle spore e delle cellule vegetative.

La sottostante Tabella VI riassume schematicamente i rilievi più importanti che sono

emersi da numerose determinazioni sperimentate *in vitro*:

Tabella VI

<i>Temperatura di incubazione</i>	<i>50° C</i>			<i>52 ° C</i>		
<i>Tempo in ore</i> <i>dell'esecuzione dei prelievi</i>	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>4</i>
Percentuale media di germinazione delle spore in latte inoculato con sieroinnesto	0	~ 19	~ 37	0	~ 44	~ 86
% di abbattimento delle cellule vegetative in latte inoculato con sieroinnesto per l'azione combinata temperatura – pH	0	~ 26	~ 53	0	~ 51	~ 91

Dai dati riportati nella parte sperimentale emerge che la temperatura ha un ruolo determinante nella germinazione delle spore, nella velocità di moltiplicazione delle forme vegetative e nella loro distruzione, soprattutto se associata ad elevata acidità.

Prove condotte in campo in caseificazioni di formaggio Provolone hanno confermato i dati di laboratorio, facendo emergere inoltre che solamente circa il 7-8 % delle spore presenti nel latte vengono trattenute nella cagliata, mentre il 92-93 % si perdono fortunatamente nel siero.

Considerando che nei formaggi a media e lunga stagionatura il difetto del gonfiore tardivo si manifesta anche quando il latte da caseificare ha un numero molto basso di spore (circa 40 per litro) e di cellule vegetative (poche centinaia per litro) e che le condizioni tecnologiche di lavorazione inducono una sensibile diminuzione delle stesse, si deve concludere che comunque è un problema di numeri, seppure molto piccoli, e pertanto è necessario adottare i parametri di

lavorazione in grado di favorire al massimo la germinazione delle spore e dall'altro distruggere le forme vegetative già presenti nel latte, ovvero generatesi dopo la rottura della parete sporale.

Si può rilevare che la maggior parte delle forme di formaggi di Provolone che manifestano il difetto di gonfiore anche dopo un mese dalla produzione sono caratterizzate da poche decine di punti che presentano occhiatura, strappi o fessure, distribuiti nella superficie della forma sezionata, con particolare addensamento al centro.

Questi punti in effetti altro non sono che le zone dove si sono formate nel tempo colonie di clostridi originatisi dai pochi individui che residuano nella forma e che costituiscono dei centri o nuclei dove, quando le condizioni della pasta del formaggio quali pH, potenziale redox, temperatura, condizioni di anaerobiosi, ecc., diventano compatibili con lo sviluppo e la moltiplicazione dei butirrici, si verifica un graduale accumulo dei loro cataboliti, ivi compresi l'idrogeno e l'anidride carbonica, causa del gonfiore butirrico.

Si comprende quindi che per evitare il difetto del gonfiore tardivo dovuto ai clostridi, senza dover ricorrere all'uso di additivi, è necessario ridurre nella forma di formaggio drasticamente il loro numero, che di per sé sembrerebbe non allarmante, sfruttando le particolari condizioni chimico-fisiche che naturalmente si riescono a instaurare entro le prime ore di vita del formaggio stesso.

Questo aspetto specifico del metodo oggetto della presente invenzione consiste nell'adottare una temperatura di cottura della cagliata più elevata rispetto allo stato dell'arte attuale, scegliendo quella che rappresenta la migliore combinazione tra la capacità di indurre la massima germinazione delle spore e la possibilità di determinare successivamente il più alto abbattimento delle forme vegetative per effetto della combinazione temperatura - pH che si è instaurata nella pasta del formaggio.

La Tabella VII sottostante illustra i risultati ottenibili con lo stesso latte contaminato da circa 400 spore e 10.000 cellule vegetative per litro.

Tabella VII

Clostridi per Kg di pasta per Provolone prima della filatura	Cottura a 50° C	Cottura a 52° C
Spore	~ 180	~ 33
Cellule vegetative	~ 980.000	~ 180.000

ESEMPIO 4

DETERMINAZIONE DEI VALORI DELLA TEMPERATURA AL CENTRO DELLE FORME DI FORMAGGIO PROVOLONE DI VARIE PEZZATURE IN ACQUA ALLA TEMPERATURA DI +5,7°C IN RICIRCOLO.

Nella Tabella VIII sono riportate le temperature verificate in forme di Provolone rispetto al tempo.

Tabella VIII

<i>Ore dalla formatura</i>	<i>Forma da 14 kg</i>	<i>Forma da 24 kg</i>
	<i>Temperatura °C</i>	
0	55	55
3	36.0	42.8
6	24.2	30.2
9	16.0	21.3
12	10.8	16.0
18	7.5	11.1

Analizzando l'andamento termico risulta evidente che per ridurre al minimo l'attività metabolica e quindi replicativa delle cellule dei clostridi e dei propionici è importante accelerare al massimo il raffreddamento per raggiungere temperature inferiori a 10-12°C.

ESEMPIO 5

DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI LIBERI IN CAMPIONI DI FORMAGGIO PROVOLONE

Nelle Tabelle da IX a XIV seguenti sono riportati i risultati di esperimenti di caseificazione condotti secondo i metodi tradizionali e secondo il metodo dell'invenzione, per il Provolone.

Dove non diversamente indicato, le quantità di acido butirrico e propionico sono indicate in mg di acido per 100 g di sostanza secca.

- i) Caseificazione senza pre-trattamento degli insilati e con trattamento di raffreddamento post formatura tradizionale

Tabella IX

Riferimento	Stagionatura	Sieroinnesto/additivi	Ac. Propionico	Ac. Butirrico
#464	1 mese ⁽¹⁾	Caseificio/ Assenti	17,40	182,84
#463	1 mese ⁽²⁾	Coltura A/Assenti	4,17	78,49

⁽¹⁾ forme rotte

⁽²⁾ sfoglie, piccoli occhi

- ii) Caseificazione senza pre-trattamento degli insilati e con trattamento di raffreddamento post formatura secondo l'invenzione

Tabella X

Riferimento	Stagionatura	Sieroinnesto/additivi	Ac. Propionico	Ac. Butirrico
#591	4 mesi	Caseificio/esamina	5,36	5,14
#592	4 mesi	Coltura A/Assenti	5,57	5,21

Tabella XI

Riferimento	Stagionatura	Sieroinnesto/additivi	Ac. Propionico	Ac. Butirrico
#383	3 mesi	Caseificio/esamina	1,34	14,37
#385	3 mesi	Coltura A/Assenti	1,16	9,49

Tabella XII

Riferimento	Stagionatura	Sieroinnesto/additivi	Ac. Propionico	Ac. Butirrico	Indice di maturaz.
#1	4 mesi	Caseificio/esamina	5,36	5,14	17,81
#2	4 mesi	Coltura A/Assenti	5,57	5,21	19,34

iii) Caseificazione con trattamento degli insilati secondo l'invenzione e trattamento di raffreddamento post formatura secondo l'invenzione

Tabella XIII

Riferimento	Stagionatura	Sieroinnesto/additivi	Ac. Propionico	Ac. Butirrico
#488	1 mesi ⁽¹⁾	Caseificio/Assenti	8,32	56,15
#489	1 mesi	Coltura A/Assenti	0,64	2,18

⁽¹⁾ forme gonfie con rotture

Tabella XIV

Riferimento	Stagionatura	Sieroinnesto/additivi	Ac. Propionico	Ac. Butirrico	Indice di maturaz.
#1	4 mesi	Caseificio/esamina	1,81	3,49	17,02
#2	4 mesi	Coltura A/Assenti	1,24	3,37	19,36 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ la differenza rilevata con l'analisi (2,34 punti) non rispecchia la realtà oggettiva, in quanto l'esame organolettico evidenzia diversità di maturazione ben più grandi a favore del formaggio prodotto con la coltura A senza conservanti.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per evitare e/o ridurre il gonfiore butirrico e/o la fermentazione propionica causati da clostridi e batteri propionici nei formaggi che comprende effettuare almeno una delle fasi (a) o (b) seguenti:
 - (a) trattare, al momento del loro insilamento, l'essenza foraggiera destinata all'alimentazione delle bovine da latte con una sospensione di colture riattivate di lattobacilli eterofermentanti facoltativi in un mezzo colturale acquoso, in ragione di almeno $1 \cdot 10^5$ lattobacilli per grammo di essenza foraggiera;
 - (b) nel processo di preparazione del formaggio, aumentare la temperatura di cottura della cagliata di 2-4°C rispetto alle temperature ordinarie previste, utilizzando al contempo sieroinnesti naturali sottoposti a induzione termica.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che nella fase (a) detta sospensione è utilizzata in ragione di almeno $1 \cdot 10^6$ lattobacilli per grammo di essenza foraggiera.
3. Metodo secondo le rivendicazioni 1 o 2, caratterizzato dal fatto che comprende inoltre raffreddare il formaggio, dopo la formatura, per immersione in acqua ad una temperatura non superiore a 9 °C fino a che la temperatura nel cuore della forma del formaggio scende ad un valore inferiore a circa 10-12°C.
4. Metodo secondo le rivendicazioni da 1 a 3, caratterizzato dal fatto che nella fase (a) detti lattobacilli sono autoctoni di detta essenza foraggiera.
5. Metodo secondo le rivendicazioni da 1 a 4, caratterizzato dal fatto che nella fase (a) detta essenza foraggiera è il mais ceroso e detti lattobacilli comprendono il *Lactobacillus plantarum* e/o il *Lactobacillus pentosus*.
6. Metodo secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che detti lattobacilli sono scelti nel gruppo che consiste in *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, *Lactobacillus plantarum*

LMG P-21021, *Lactobacillus plantarum* LMG P-21022, *Lactobacillus plantarum* LMG P-21023, *Lactobacillus pentosus* LMG P-21019 e le loro miscele.

7. Metodo secondo le rivendicazioni da 1 a 6, caratterizzato dal fatto che nella fase (a) detta mezzo colturale comprende elementi nutritivi per detti lattobacilli e un sistema tampone.
8. Metodo secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che detto sistema tampone è un sistema fosfato bisodico/fosfato monopotassico.
9. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che nella fase (b) detta temperatura di cottura della cagliata è di 50-53°C per i formaggi a pasta filata e di 54-56 °C per i formaggi a pasta dura.
10. Metodo secondo le rivendicazioni 1, 3 o 9, caratterizzato dal fatto che detti sieroinnesti naturali sono autoctoni di ogni caseificio.
11. Metodo secondo le rivendicazioni 1, 3, 9 o 10 caratterizzato dal fatto che detta induzione termica è condotta fino a completo adattamento dei siero innesti naturali alle dette temperature.
12. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che comprende effettuare sequenzialmente entrambe le fasi (a) e (b).
13. Metodo secondo la rivendicazione 12, che comprende inoltre raffreddare il formaggio, dopo la formatura, per immersione in acqua alla temperatura non superiore a 9 °C fino a che la temperatura nel cuore della forma scende ad un valore inferiore a circa 10-12°C.
14. Metodo secondo le rivendicazioni 3 o 13, caratterizzato dal fatto che detto raffreddamento è condotto in acqua alla temperatura di 3-7°C.
15. Metodo secondo la rivendicazione 14, caratterizzato dal fatto che detto raffreddamento è condotto in sistemi dinamici a ricircolo di acqua fredda.
16. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, per la produzione di formaggi a media e lunga stagionatura privi di additivi.

17. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, per la produzione dei formaggi Provolone, Grana Padano, Montasio e Asiago.
18. Formaggio a media e lunga stagionatura esente da additivi ottenuto con il metodo delle rivendicazioni da 1 a 17.
19. Lattobacillo scelto nel gruppo che consiste in *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, *Lactobacillus plantarum* LMG P-21021, *Lactobacillus plantarum* LMG P-21021, *Lactobacillus plantarum* LMG P-21023, *Lactobacillus pentosus* LMG P-21019 e le loro miscele.
20. Uso di almeno un Lattobacillo della rivendicazione 19 per il trattamento delle essenze foraggiere destinate all'alimentazione delle bovine da latte.
21. Uso di sieroinnesti naturali sottoposti ad induzione termica per effettuare caseificazioni condotte senza l'uso di additivi.
22. Uso secondo la rivendicazione 21, in cui detti sieroinnesti naturali provengono dai sieri di fine caseificazione autoctoni di ogni caseificio e specifici dei singoli formaggi per i quali essi sono utilizzati.

Ing. G. Marietti (N° Iscr. 175)
Dr. G. Gislou (N. Iscr. 513)
Ing. G. Valentini (N° Iscr. 539)
Dr. T. Santoro (N° Iscr. 537)



Description of the invention entitled:

METHOD FOR ELIMINATING AND/OR REDUCING THE DEFECTS
FROM BUTYRIC AND PROPIONIC FERMENTATION IN CHEESES AND
CHEESES OBTAINED WITH SUCH METHOD

In the name of LABORATORIO MICROBIOLOGICO GRANA PROVO-
LONE S.r.l.,

Italian nationality, with main office in NOVARA

Inventors: - MOGNA, Giovanni
 - ALLOISIO, Vito
 - STROZZI, Gian Paolo

* * * * *

DESCRIPTION

The present invention relates to the inhibition of the clostridia and propionic bacteria activity in cheeses, in particular in medium and long seasoning-cheeses, by a strategy concerning all the agrozootechnical chain and the dairy transformation industry.

In particular, the invention relates to a method for avoiding and/or reducing the butyric swelling and/or the propionic fermentation caused by clostridia and propionic bacteria in the medium and long seasoning-cheeses by specific treatments carried out within the making process of the cheese, aimed to the decontamination from clostridia, already starting from the treatment of the forage ensilages intended for the

dairy cattle feeding.

The *Clostridia* are GRAM-positive spore-forming germs, and for such reason highly heat-resistant, anaerobic with a fermentative metabolism which leads to the production of large quantities of gases (CO_2 and H_2) and other by-products, such as butyric acid, acetic acid, ethanol, butanol, isopropanol, acetone; they are further able to lead to the anaerobic decomposition of the proteins. They are found, as a primary habitat, in the earth and the waters and following to contamination also in the forage ensilages, cattle foods and many products intended for the human diet, such as the vegetables, the meat, the milk and the dairy products, the fishing and confectionery ones.

Some species of *clostridia*, above all those of the group II with a strong proteolytic and saccharolytic action are pathogenic for the humans. By way of illustrative example, we mention *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*, *Cl. tetani* and *Cl. septicum* which produce exotoxins, highly toxic proteinic substances capable of determining serious illnesses, such as botulism, gas gangrene, tetanus and food toxinfection forms.

Other species, belonging to physiological aggregates different from the group II, such as for example *Cl. butyricum*, *Cl. tyrobutyricum* and *Cl. sporogenes* are,

on the contrary, able to determine serious defects in multiple food products, with a particular reference to the dairy products, for the ability of also fermenting the lactic acid produced by the lactic bacteria during their development in the curd and subsequently in the cheese paste, causing the so-called "late swelling". The propionic bacteria, sometimes defined as "propionics" hereinafter, are rod-like GRAM-positive germs, non mobil and without spores, which perform the propionic fermentation starting from glucose with a formation of propionic acid, acetic acid, lower quantities of other acids and carbon dioxide.

The *Propionibacterium freudenreichii* species is able to use also the lactic acid with the formation of the same catabolites.

Four species are of a dairy interest and, if existing in the milk in a high number, can cause in the first seasoning months an undesired, diffused eyeleting in the medium and long seasoning-whole cheeses, with heavy economical damages.

The cheeses most exposed to the swelling risk are those with a medium and long seasoning due to the particular physical-chemical conditions which occur within the cheeses. The *Clostridium* spores existing in the milk find in the curd and then in the cheese fa-

vourable conditions to their germination and development, producing large quantities of gases (hydrogen and carbon dioxide) with a consequent swelling of the whole cheeses and defects in the paste structure due to the presence of irregular eyelet, marked exfoliation, spongy appearance and crackings. Sometimes, the eyelets are of such dimensions to determine the swelling of the whole cheese itself and, in the most serious cases, a real splitting occurs.

Although minimum quantities of butyric and propionic acids can be desired in order to impart the typical particular fragrance to the cheese, the formation of an excessive quantity of butyric and propionic acids determines the impossibility of commercialising the imperfect whole cheeses due to unpleasant aspect, taste and smell.

A strong increase of the swelling phenomenon in the medium and long seasoning-cheeses has been found in the last decades because of the increased contamination of the milk from the clostridia and the propionics caused by the increasing use of "ensiled" fodders, above all waxy maize, in the feeding of the dairy cattle.

The ensilages result carriers of many butyric and propionic germs as a consequence of a soil contamina-

tion which occurs at the time of the ensilage of the forage essence.

The extent of the contamination with the soil and the occurrence of particular conditions within a mass ensiled with incorrect procedures cause many ensiled fodders, at the time of their use, to result polluted by a high number of spores (up to 10^6 per gram).

The contamination of the agro-zootechnical habitat is then further aggravated because of the ingestion from the cattle of the spores contained in the ensilage which, passing undamaged in the rumen, have the possibility of germinating and rising in number in the intestine, for then passing in the feces and being distributed in the bedstead.

The milk pollution with clostridia spores already begins at the contact with the mamma, due to a poor hygiene of the same, and is then subsequently aggravated due to the contact with equipments soiled with earth, feces and/or ensilages until it reaches values of 10^4 and more per litre of milk.

It is useful to remember that in medium and long seasoning-cheeses a very low number of *Clostridium* per litre of milk (approximately 40 microorganisms per litre) is sufficient to determine conditions of late swelling risk. In fact, in most of these cheeses the

paste remains mild (the pH never falls below 4.90) and the redox potential value is certainly favorable to the spores germination and their multiplication.

Among the existing sporogenic germs, the most dangerous for the fermentations in cheeses is the *Clostridium tyrobutyricum*, because it is capable of using, for its own growth throughout the seasoning period of the cheese, the lactic acid produced by the lactic bacteria used in the caseation.

The *Clostridium tyrobutyricum* is able to grow up to a pH 4.65 and not even some technological factors that the dairy tradition has improved over time in order to contrast with the phenomenon, such as the obtainment of a low moisture content and a high concentration of sodium chloride in the paste, give sufficient guarantees to avoid the butyric fermentation.

Currently, the difficult to contain the clostridia development is made even greater due to the worsening of the physical-chemical qualities of the milk which determine weaker clots and therefore incomplete drainings.

In all the Countries in which there are dairy productions subject to swelling (Grana Padano, Provolone, Parmigiano Reggiano, Asiago, Montasio, Emmentaler, Gruyere, Cheddar, Sbrinz, Feta, Mimolette, Sait Pau-

lin, Gouda) the damage for the producers is very considerable and for this reason different strategies suitable for avoiding, or at least contrasting, the development of the butyric and propionic germs have been elaborated.

The means for controlling the swelling can be divided in two main classes: the first one is based on techniques suitable for reducing the number of spores and propionics in the milk to be caseated, the second one, on the contrary, tries to block the development thereof in the cheese paste through the use of chemical additives.

Among the traditional techniques used for reducing the number of spores already existing in the milk, we mention the rising of the milk itself in a basin, consisting of the distribution and the rest of the milk for many hours in containers with a height of 20-30 cm at the temperature of 10-16°C; in this way, the lumps of fat join together, rise on the surface by forming the cream and pull away most of the bacteria and the clostridia spores.

A substitutive, more modern technique is to undergo to centrifugation the milk to be caseated. The spores, characterized by a greater milk density (1.2 versus 1.03), due to the centrifugal force tend to accumulate

in the heavy part which is separated from the light fraction.

In the last years, another technology equally suitable for the reduction of the spore number, the microfiltration, has been introduced. Such technique consists of the passage of the milk through membranes of different materials (e.g. ceramic, polysulfone, etc.) characterized by such a porosity that it allows the passage of the proteinic, glucide, lipidic and saline components, by retaining, vice versa, the particles, among these the butyric clostridia, with a diameter higher than the porosity of the membrane itself.

The diffusion of these physical-mechanical separation techniques has been hindered, for the cheeses of origin, by restrictive rules which actually prohibit the use thereof because they are not considered in conformity with the "fair and constant uses", whereas for the common cheeses, the high investment cost has constituted a deterrent factor and also the fact that, parallelly to the reduction of the anti-dairy microflora, a lowering of the pro-dairy microflora, with a consequent flattening of the organoleptic features of the end products, occurs.

As for the traditional method of the "rising in a basin", it is important to report that it is exclusively

useable for the partly skimmed cheeses and however also with reference to them, it has proved to be inadequate for avoiding the swelling phenomenon when the content of spores and propionic bacteria in the milk exceeds certain limits.

For these reasons, the recent legislation has allowed the use of food additives in form of preservatives and bactericidal substances; in particular, for the cheeses the following additives are currently foreseen:

- a) potassium nitrate (E 252)
- b) Hexamethylene tetraamine (E 239)
- c) Nisine (E 234)
- d) Lysozyme (E 1105)

which, with different action mechanisms, are able to inhibit and/or contain the clostridia and propionics development, at least when their number in the curd is not excessively high.

Generally, the addition of additives, also when allowed by the laws in force, is to be considered a negative factor both for the quality of the food itself and for the sanitary aspects caused to the health of the consumers, due to the possible toxicological, cancerogenic effects and those involving the intestinal ecosystem.

The potassium nitrate, allowed as a maximum residual up to 50 mg/kg for the "hard, medium-hard and medium-soft cheese", is dangerous for the consumers' health as it can be transformed in nitrosamine, with a doubtful cancerogenic action.

The hexamethylene tetraamine (or "hexamine") is a formaldehyde polymer allowed by the laws in force, even if it is very discussed, for the Provolone cheese at the maximum dose of 25 mg/Kg of residue, expressed as formaldehyde. It is normally added at the moment of the paste spinning in the hot water used for this purpose.

The nisine is part of a group of antibacterial substances, called bacteriocins, which are secondary metabolites of a microbial origin and a peptide nature, also defined as lantibiotics, active against the GRAM-positive germs and particularly those sporule-producing. The anti-clostridia action mechanism consists of blocking the germination during the swelling step of the spores for the deactivation of the sulfhydrylic residues of the membrane phospholipoproteins. For the seasoned cheeses, a maximum dose up to 12.5 mg/kg is allowed.

The lysozyme is an enzyme of a proteinic nature (muremidase) having a lytic activity to the mucopolysaccha-

ride structure of the cell wall of the GRAM-positive bacteria: with reference to the clostridia, its action mechanism consists of lysating the vegetative form as soon as it exits from the spore. The lysozyme, in Italy allowed by the law also for the D.O.P. (Protected Denomination of Origin) cheeses Grana Padano, Provolone, Valpadana, Asiago and Montasio in the dosage "as much as is sufficient", is usually added to the milk in the boiler in an extent of 20-25 ppm, to which correspond approximately 300 ppm in the cheese, a dose which is considered sufficient to ensure a good control of the late swelling.

In many non-European Countries with a poor dairy tradition, also the hydrogen peroxide is used, that is the common hydrogen peroxide capable of destroying several vegetative forms existing in the milk.

In Italy, for a long time, the use of the formaldehyde in the transformation of the milk to Grana Padano, essentially used for the inhibiting action towards the propionic bacteria and coliforms and only marginally towards the sporogenic germs, has been allowed.

It is further known that all the additives above-mentioned do not have a selective specific action against the clostridia and propionics, but they play a bacteriostatic action and even a bactericidal action

towards many bacterial groups, including those "pro-dairy", whose presence and growth speed affect all the fundamental technological parameters of the productive cycle. The absence or however a lessened lactic fermentation negatively affects the structural features of the curd and subsequently of the cheese in the ripening step, by compromising the quality of the end product and slowing down the seasoning thereof.

An aim of the present invention is to avoid and/or reduce the late swelling and the propionic fermentation in cheeses, in particular in the medium and long-seasoning cheeses, without using additives, potentially dangerous for the consumer's health and however being an indirect cause of structural and organoleptic modifications of the cheeses, typical for the alterations induced by the same on the composition of the natural microflora of the milk and for the strong inhibition exerted on the natural (or selected) culture used in the caseation.

The method of the present invention is particularly suitable for the making of cheeses, such as Provolone, Montasio, Asiago, Grana Padano and the Parmigiano Reggiano.

By the term "additives" is understood to mean, according to the invention, any substance added for a pre-

servative and/or bactericidal purpose to the milk and/or the cheese during the different processing steps.

The absence of some additives in the cheeses prepared according to the inventive method, besides avoiding all the dangerous effects of such substances and preserving the "genuineness" of the cheeses thus produced, allows to short the ripening and seasoning times, therefore allowing to obtain an important result from the economical and commercial point of views.

The invention then relates to a method of biological control suitable for preventing the milk contamination from the clostridia responsible for the late swelling and the propionic bacteria responsible for the propionic fermentation in cheeses, in particular in the medium-and long seasoning-cheeses, in the absence of additives.

More particularly, the present invention relates to a method for reducing and/or avoiding the butyric and propionic fermentation in the medium and long-seasoning cheeses, said method alternately or sequentially foreseeing at least the carrying out of two steps (a) and (b), as defined in the claims 1 and following.

The step called (a) consists of the treatment, at the time of the ensilage, of the forage essences intended for the feeding of the dairy cattle with liquid cultures of hetero-fermenting facultative reactivated lactobacilli, capable of immediately colonizing the whole ensiled mass and producing a fast pH lowering, which prevents the sporogenic and propionic germs, normally existing in the cut forage (for the inevitable contamination with the earth) from multiplying and therefore reaching high charges.

The terms "reactivated lactobacilli" or "reactivated cultures" mean, according to the present invention, that the lactobacilli are perfectly active and viable, having finished their biological reproductive cycle in proper liquid substrates immediately before the distribution on the cut forage.

A first innovation with respect to the current state of the art is in fact the use of specific microbial cultures for the single forage essences, each one preferably being formed by lactobacilli insulated from the autochthonous epiphyte microflora of the same vegetable typology to which it is intended. Such specificity ensures, at the moment of the ensilage, an immediate colonization from the inoculated strains, already perfectly accustomed to use the nitrogen and

glucide sources typical of that specific forage essence.

Generally, the bacterial cultures for the treatment of the ensilages are commercialised and used at the dehydrated state, that is in form of powder, and therefore characterized by a very prolonged latency step which delays the beginning of the cell reproduction.

Concerning this, it is appropriate to remember that any living cell subjected to drying, also with particularly delicate dehydration processes, such as the freeze-drying, is more or less suffering and requires a certain time in order to restore its own full effectiveness and viability. The prolongation of the latency step means a more or less considerable delay in the colonization times of the vegetable substrate, allowing the dangerous germs to replicate themselves and determine those negative phenomena that the bacterial culture should avoid.

Preferably, the bacterial cultures suitable for the treatment of the ensilages according to the invention consist of complex microbial associations of strains of "wild type" (also called wild or natural) facultative hetero-fermenting lactobacilli insulated from the specific vegetable essences to which they are intended for the purpose of the ensilage (waxy maize, clovers

greens, such as lucern and trifolium, gramineae greens such as English ryegrass, Italian ryegrass and triticale) and are selected as a function of the predominant caseation to which the milk, coming from the farms which perform the silage treatment, is intended. According to an advantageous aspect, the lactobacilli are selected from the group including the *Lactobacillus plantarum* and the *Lactobacillus pentosus*.

According to a particularly advantageous aspect, the lactobacilli are selected from the group including the following lactobacilli filed according to the Budapest Treaty on the International acknowledgement of the microorganisms deposit of April 28th 1997, c/o the BCCM/LMG Bacteria Collection, in Gent-Belgium on the day October 16th 2001, with the following access numbers:

Lactobacillus pentosus: LMG P-21019

Lactobacillus plantarum: LMG P-21020

Lactobacillus plantarum: LMG P-21021

Lactobacillus plantarum: LMG P-21022

Lactobacillus plantarum: LMG P-21023.

Such lactobacilli, whose features are shown in the Example 2 below, are new and constitute a further subject of the present invention.

The use of such lactobacilli in the treatment of the

ensilated fodders according to the invention forms another subject of the present invention.

According to a preferred aspect of the present invention, the step (a) consists of the use of the bacterial culture at the liquid state, subject to "activation" to be carried out in the hours immediately before the operations of the silo preparation.

According to a preferable aspect of the invention, such treatment can be carried out with a proper equipment, as described in the Italian patent no. 1226750 issued on February 5th 1991 entitled "Kit for the reactivation of dehydrated microbial cultures, in particular bacteria".

The kit of the above-mentioned patent substantially includes a 10 litres sterile tank made in polyethylene containing the freeze-dried culture and a specific cultural dry substrate which, after rehydration with drinking water at a temperature of 26-30°C allows an optimal reactivation of the bacterial cells; a casing made in expanded material, divided in two halves and capable of completely containing, after the reassembly of the parts, the tank and therefore insulating the culture at the desired temperature throughout the reactivation step, completes the equipment.

In the formulation of the cultural substrate, in addi-

tion to the nutritive values for the lactobacilli, there is a buffer system which, by avoiding an excessive lowering of the pH, allows to obtain a bacterial population, at the end of the reactivation, higher than $5 \cdot 10^9$ UFC/ml.

According to an advantageous aspect of the invention, the lactobacilli suspension contains the sodium monohydrogenphosphate/potassium dihydrogenphosphate buffer system.

The lactobacilli thus reactivated are inoculated in the vegetable mass intended for the ensilage in an extent of at least $1 \cdot 10^5$, preferably at least $1 \cdot 10^6$ per gram of vegetable mass and are able to establish a rapid and strong lactic fermentation capable of inhibiting the development of the harmful microorganisms and ensuring the good preservation of the fodder without remarkable losses of dry substance and energy.

In the experimental part, some examples of suspensions suitable for the treatment of the ensilaged fodders according to the present invention are provided as non limiting examples.

The results of the experiments carried out by the applicant and reported in the following experimental part show that the milk of the dairy cattle fed with an ensilage processed with the Culture A, having a

high biological activity, has a number of spores significantly lower than the milk produced in the stable whose animals have been fed with "unprocessed" ensilage.

It is easily understood that the qualitative improvement of the processed ensiled fodders is positively reflected along all the chain which has in the stable its point of arrival and allows to significantly reduce the clostridia contamination in the cheese produced by using the milk coming from cattle thus fed. Alternatively (or, if desired, sequentially), a marked decrease of the clostridia in the cheese (and consequently a reduction of the late swelling caused by the same) can be obtained by carrying out a technological transformation process suitable for affecting and guiding in the desired direction the life cycle of the clostridia in the first 24 hours of life within the paste of medium and long seasoning cheeses. Such process (step (b) of the invention) promotes, in said period of time, the germination of almost all the spores of the butyric germs existing in the curd, by stimulating the passage from the form highly resistant to all the physical-chemical shocks (spore) to the vegetative one; in the same span, the process subject of the invention is able to destroy almost all the propi-

onic bacteria and the vegetative cells of the clostridia existing in the curd, through a particular combination of higher temperature and guaranteed acidity through the use of serum-grafts adapted to live and proliferate at such temperatures.

For the comprehension purposes of the method subject of this specific point of the invention, it is important to diagrammatically refer to the biological cycle which characterizes the germs having endospores, such as the clostridia.

In particular these latter (*Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum* and *C. sporogenes*), responsible for the swelling phenomenon in the medium and long seasoning cheeses, are able to form subterminal, oval or round-shaped endospores of dimensions between 2.4-3.0 μm x 1.0-1.3 μm .

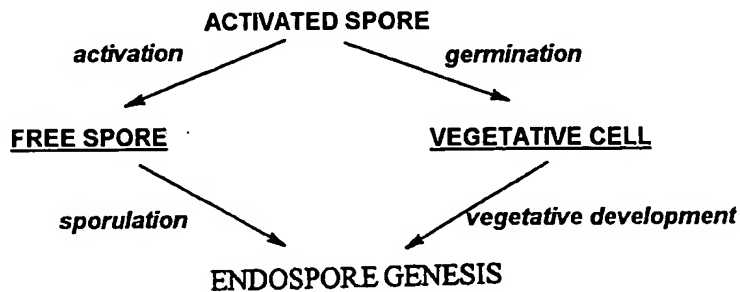
Their life cycle is essentially characterized by two biological states:

1. The spore state, wherein the cell coated with a wall highly resistant to the physical-chemical agents is in a strongly dehydrated condition with a practically null metabolism. It can remain in such a latent state for very long periods of time, waiting for the establishment of conditions suitable for its own development.

2. The vegetative cell state, which represents the viable step of the cycle during which the cells in a full metabolic activity reproduce themselves by binary scission and produce, starting from carbohydrates, organic acids (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*) and proteins (*C. sporogenes*), butyric and acetic acids, several alcohols, carbon dioxide and hydrogen.

In order to pass from a state to the other the clostridia cross different steps, all promoted or impeded by the particular environmental conditions in which the cells are found, such as for example the value of the available free water (A_w), the substrate composition, the temperature, the anaerobiosis conditions, the oxide-reductive potential and the pH value.

The *in vitro* close examination of the life cycle of the clostridia with laboratory tests and in the curd of medium and long seasoning cheeses has constituted the scientific premise which is at the base of the technological innovations introduced with the present invention.



The experimentations carried out have helped to understand why, also compared with milk with limited contamination levels with regard to the number of spores and vegetative forms of clostridia, almost all the whole cheeses with a long and medium seasoning-paste are destined to present the late swelling defect during the seasoning.

Several laboratory tests have been carried out in raised milk intended for the making of long and medium seasoning-cheese, after artificial contamination of the same with maize ensilage containing a known number of butyric spores.

A part of the research has further been aimed at the knowledge of the percentage of the spore germination, the generation time of the vegetative cells and the knocking down of the same determined by the particular physical-chemical conditions which are established with the variation of the cooking temperature of the curd and the acidity of the cheese paste.

In view of the mentioned data and the caseation experimentations carried out on medium and long seasoning-cheeses, reported in the following experimental part, it is emerged that the optimal cooking temperature must be increased of 2-4°C with respect to the rule, as a function of the milk quality and the ther-

mophily of the graft to be used in caseation.

The possibility of carrying out a cooking of the curd with higher temperatures than the common procedure, without compromising the acidification, results from the peculiar technological characteristics of the bacterial culture of the serum-graft, which must be able to carry out a fast and strong lactic fermentation also at a temperature of 2-4°C higher than the one normally used, by ensuring a pH value, throughout the processing cycle, equal or even lower than the one which is found in a curd obtained with the usual technological parameters.

The property of the culture to normally reproduce itself at such high temperatures is induced through a series of passages (subcultures) at a gradually higher temperature, such to select within the microbial complexity of the culture, those lactobacilli strains more predisposed to grow up in these particular cultural conditions.

This specific aspect of the invention exploits, indeed, the characteristic common to all the natural bacterial cultures with a large general genetic variability for the presence in the bacterial association of a multiplicity of biotypes and variety, therefore capable of answer, also in relatively short times, to

modifications of the cultural conditions.

In particular, the natural cultures of lactic bacteria used for the caseation of most of the medium and long seasoning-cheeses consist of very complex associations which spontaneously develop themselves in the residual caseation serum of the preceding day and for this reason they are defined "natural serum-grafts", characterized by a strong synergism which occurs between the biotypes of the existing lactobacilli.

The cultural conditions tested relatively to this important point of the anti-clostridia strategy subject of the present invention, consist of the incubation of the residual processing serums, collected by the cheese factories, according to a determined automatically-controlled heat cycle, which starts with a temperature lower than 2°C with respect to the cooking one detected in the cheese factory and which ends, with a descending course in a thermal gradient of about 1.5°C per hour, at the temperature of about 20°C findable at the end of an incubation of about 20 hours. The culture is now subjected to rapid cooling through circulation, within the jacket of the fermentation container, of ice cold water at $4-5^{\circ}\text{C}$.

The method for carrying out the thermal induction foreseen by the present invention foresees that each

day a subculture is performed, starting the thermal cycle at a temperature higher than 0.3°C with respect to that used the preceding day. In the first incubation hours of each transplant, the biotypes of the most thermophile lactobacilli start to reproduce themselves faster than those less thermophile, increasing the number at each passage until to determine a significantly important population, but never exclusive for the possibility of the less thermophile varieties to develop themselves when the temperature starts to decrease.

Within 10-15 days, the culture which is produced normally has a fermentative activity at a high temperature similar to that possessed by the same culture if developed at a normal temperature.

In order to obtain such result, it is indispensable to know the development dynamic of the whole bacterial population, by avoiding to stress the culture with too long incubation times or such cultural conditions to induce mortality or however suffering to the different lactobacilli species. It is very important to study the replication times of the different bacterial species with the variation of the cultural conditions, so as to block the reproduction when the population is still in an exponential growth step, that is before

the accumulation of the catabolites produced by the same bacteria. Among these, the most devastating for the bacterial cells is certainly the lactic acid which, when it exceeds determined concentrations in the culture means, becomes very toxic and firstly leads to suffering and next to death of the bacterial cell.

As for the ability of multiplying at temperatures higher than 2-4°C with respect to those normally used in a cheese factory, we have been able to verify that all the species of "wild type" lactobacilli (*L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. casei*) forming the natural cultures for medium and long seasoning-cheeses, show this adaptation ability.

In particular, the species *L. helveticus* shows an aptitude slightly higher than the other typologies, but in each case at the end of the thermal induction treatment the bacterial population is however formed by the same bacterial species initially existing in the culture and in very similar numerical ratios.

The use of natural serum-grafts subjected to thermal induction for carrying out caseations without the use of additives is a further aspect of the invention.

The method of the invention, including to carry out at

least alternatively or, advantageously, sequentially, the steps (a) and (B) described and claimed herein, is therefore able to provide medium and long seasoning-cheeses which show a reduced butyric and propionic fermentation and consequently a decrease of the late and early swelling.

Such surprising effect is shown in detail in the following experimental part, where also the end results of caseation experiments carried out according to the traditional methods and according to the method of the invention are reported. In particular, the results reported in the Example 5 clearly show that the treatment of the invention, in particular the choice of the step (b) which uses the Culture A (described in the Example 2) provides results which are comparable, if not better, to those obtainable with the use of the additives.

According to another preferred aspect of the invention, it is possible to carry out a final treatment intended for the inhibition of the growth and the activity of the clostridia in the whole cheese, considered after the first 24 hours from its production; such treatment is of a physical nature and is able to avoid and/or reduce the butyric and propionic fermentation.

Said treatment essentially consists of cooling the whole cheese after the forming, by dipping in water at a temperature not higher than 9°C, preferably between 3 and 7°C, until the temperature in the core of the cheese decreases to a value lower or equal to 10-12°C. As a function of the mass in the different cheeses, the cooling can be carried out in a dynamic or a static way. Always depending on the dimensions, temperatures in the core of the cheese of 10°C or lower, for the smaller sizes, and temperatures slightly higher for the bigger sizes can be reached.

This treatment is particularly successfully applicable to cheeses with a spun paste, such as Provolas and Provolone, for the production of which the state of the art currently foresees the use of hexamethylene-tetramine for contrasting the swelling.

The aim which is attained with the early cooling of the whole cheeses consists of avoiding the vegetative cells of the clostridia survived to the adverse conditions induced by the treatments of the steps (a) and/or (b) according to the invention, if any, from developing and producing gases, and the spores of the same, still existing in such state in the whole cheese, if any, from germinating and in this way generating new vegetative cells. With this treatment,

also the propionic fermentation is completely inhibited or however remarkably reduced.

The optimization of the present aspect of the invention has been made possible from the *in vitro* investigation of the life cycle of the clostridia, through experimentations which have allowed to know:

- the temperature above which the spores are no more able to germinate
- the replication time of the vegetative forms at different temperatures.

With reference to the first point, evaluated at pH 5.3 which represents the condition similar to the one which is found in most of the cheeses with cooked, medium-cooked and spun paste in the first 12-24 hours, the applicant has been able to ascertain that below 8-9°C, as a function of the clostridia species, the germination of the spores does not occur.

Below such a temperature, namely, it is possible to block the vegetative cycle of the clostridia, by maintaining the form of spore resistance in a resting state and therefore such that it does not cause any damage.

In other words, the spores which would remain as such in the cheese paste at the end of the caseation, despite the action which stimulate the germination car-

ried out in the treatment of the step (b) of the present invention, do not have the possibility of proliferating when the temperature of the cheese paste is lower than 9°C, preferably at a temperature of 7-8°C.

A second and fundamental knowledge element relates to the replication time of the vegetative cells at the different temperatures because the proliferation speed and therefore the number of clostridia which can be formed in a certain time logically depend on the duration of a binary scission.

As for this point, always evaluated at pH 5.3 because of the reasons above mentioned, we have been able to ascertain that the optimal development temperature, that is the one in which the replication time is short, is about 24°C, unlike the temperature of 37°C reported in literature.

The data found in the experimentations carried out in laboratory, which have allowed to verify this parameter indispensable for carrying out a biological control adequate to the butyric and propionic fermentation, are shown in the following Table:

Incubation temperature of a milk acidified at pH 5.3 contaminated at the zero time by no. 2,500 spores of butyric clostridia per litre	Mean replication time	Number of vegetative cells per litre which are reproduced in a 48 hours incubation
6° C	-	-
8° C	not determinable	~ 100
10° C	~ 13,0 hours	~ 14.000
15° C	~ 7,8 hours	~ 175.000
24° C	~ 3,1 hours	~ 200.000.000
30° C	~ 4,8 hours	~ 16.000.000
37° C	~ 7,7 hours	~ 150.000
44° C	-	-

Such data, associated with the knowledge of the thermal decay curve which occurs within the whole cheeses in the first 48 hours of life, allow to set a cooling of the cheeses themselves with such times and procedures to shorten at the most the residence at the most dangerous temperatures, thus avoiding the increase of the clostridia population.

The examples which are provided in the following Experimental part show in detail the invention and are not intended to limit it in any way.

EXPERIMENTAL PART

EXAMPLE 1

FORMULATION OF THE CULTURE SUBSTRATE

A formulation of the culture substrate, inserted in

the tank and suitable for preparing 10 litres of reactivated culture of the Example 2 below, intended for the treatment of 500 quintals of ensilage, is the following:

- Vegetable peptone	g 80
- Soy peptone	g 40
- Dextrose	g 500
- Yeast extract	g 30
- Monosodium glutamate	g 100
- Dry sodium monohydrogenphosphate	g 11.46
- Potassium dihydrogenphosphate	g 79.75
- Manganese sulfate	g 2.50

EXAMPLE 2

INHIBITION OF THE CLOSTRIDIA IN THE WAXY MAIZE ENSILAGES WITH A BACTERIAL CULTURE CONSISTED OF "WILD TYPE" STRAINS OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* AND *LACTOBACILLUS PENTOSUS*.

Referring to the waxy maize, the most ensiled and most used vegetable in the feeding of dairy cattle, the best results have been attained by using a complex bacterial culture called, hereinafter, "Culture A", formed by four different biotypes of *Lactobacillus plantarum* and by a strain of *Lactobacillus pentosus*, filed c/o the BCCM/LMG Bacteria Collection in Belgium, on October 16th 2001 with the following access num-

bers: LMG P-21019, LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022, LMG P-21023.

The aforesaid strains show the following common features:

- insulated and/or short-chained gram-positive rods
- facultative hetero-fermenting agents
- no growth at 45°C
- inability to produce ammonia from arginine

They are further characterized by the ability of fermenting the following carbohydrates, as reported in the Table 1:

Table 1

		<i>L. plantarum</i> LMG P-21021	<i>L. plantarum</i> LMG P-21020	<i>L. plantarum</i> LMG P-21023	<i>L. plantarum</i> LMG P-21022	<i>L. pentosus</i> LMG P-21019
1	Glycerol					+
2	Erythritol					
3	D-arabinose					
4	L-arabinose	+	+		+	+
5	Ribose	+	+	+	+	+
6	D-xylose					+
7	L-xylose					
8	Adonitol					
9	6-Methyl-xyloside					
10	Galactose	+	+	+	+	+
11	D-glucose	+	+	+	+	+
12	D-fructose	+	+	+	+	+
13	D-mannose	+	+	+	+	+
14	L-sorbose					
15	Rhamnose		+	+		+
16	Dulcitol					+
17	Inositol					
18	Mannitol	+	+	+	+	+
19	Sorbitol	+	+	+	+	+

20	α -methyl-D-mannoside	+	+	+	+	
21	α -methyl-D-glucoside					+
22	N-acetyl glucosamine	+	+	+	+	+
23	Amygdalin	+	+	+	+	+
24	Arbutin	+	+	+	+	+
25	Esculin	+	+	+	+	+
26	Salicin	+	+	+	+	+
27	Cellobiose	+	+	+	+	+
28	Maltose	+	+	+	+	+
29	Lactose	+	+	+	+	+
30	Melibiose	+	+	+	+	+
31	Sucrose	+	+	+	+	+
32	Trehalose	+	+	+	+	+
33	Inulin					
34	Melezytose	+	+	+	+	+
35	D-Raffinose	+	+	+	+	+
36	Starch					
37	Glycogen					
38	Xylitol					
39	β -Gentobiose	+	+	+	+	+
40	D-Turanose	+	+	+		
41	D-Lyxose					
42	D-Tagatose					
43	D-Fucose					

44	L-Fucose					
45	D-Arabitol					
46	L-Arabitol					
47	Gluconate	+	+	+	+	
48	2 keto-gluconate					
49	5 keto-gluconate					

Said 5 lactobacilli strains, insulated from maize, if grown in a maize juice (obtained by trituration of 0.5 kg of vegetable, harvested in a complete waxy ripening, in 1 litre of distilled water, subsequent coarse filtration, pH adjustment at 5.70 and sterilization at 121°C over 15 minutes) are able to produce within 24 hours, at the temperature of 28°C and with a 1% inoculum, the quantities of lactic and acetic acids shown in the Table II:

Table II

	Total lactic acid (g/litre)	Lactic acid Isomer D %	Lactic acid Isomer L %	Acetic acid (g/litre)	pH at 24 hours
<i>L. plantarum</i> LMG P-21021	6,56	63	37	0,15	3,51
<i>L. plantarum</i> LMG P-21020	5,18	83	17	0,14	3,50
<i>L. plantarum</i> LMG P-21023	5,20	85	15	0,29	3,47
<i>L. plantarum</i> LMG P-21022	5,83	68	32	0,19	3,58
<i>L. pentosus</i> LMG P-21019	6,85	61	39	0,12	3,46

Some experimentations have pointed out that the treat-

ment of the waxy cut maize with the Culture A of reactivated lactobacilli ensures a fast pH lowering (average 3.65) which biologically stabilizes the silo and determines, in addition to an improvement of all the physical-chemical and nutritive parameters, also a clear inhibition action towards the clostridia and the propionic bacteria.

The analysis carried out on the cut treated with the Culture A, activated at the liquid state according to the invention, always in parallel with non-treated and/or treated silos with aspecific lactobacilli cultures in a freeze-dried form, have pointed out the results shown in the Table III:

Table III

Analytical determinations	Ensilages "treated" with Culture A	Ensilages "treated" with aspecific freeze-dried lactobacilli cultures	Non-"treated" ensilages
Appearance	excellent	good	varying
Desirability	excellent	fair	varying
Internal temperature (°C)	18,9	25,5	30,3
Dry substance in %	32,7	31,4	29,6
pH at the time of de-ensilage	3,69	4,18	4,27

Forage Units per quintal		27,4	24,6	22,5
Energetic concentration (F.U./ Kg d.s.)		0,84	0,78	0,76
Ammonia nitrogen percentage on the total nitrogen		4,07	4,83	7,17
	lactic acid	4,46	3,58	3,06
Fat acids in % of the d.s.	acetic acid	1,83	1,73	3,41
	propionic acid	0,11	0,19	0,26
	butyric acid	traces	0,11	0,27

With regard to the distribution of the clostridia spores, the following Table IV summarizes the mean value found:

Table IV

Number of spores per gram	Ensilages "treated" with Culture A	Ensilages "treated" with aspecific freeze-dried lactobacilli cultures	Non-"treated" ensilages
less than 100	80 %	-	-
from 101 to 1,000	20 %	70 %	25 %
from 1,001 to 10,000	-	30 %	55 %
over 10,000	-	-	20 %

The data of the tables point out a clear qualitative improvement with regard to the nutritive properties and the number of butyric sporigens and propionic bac-

teria of the maize ensilages "treated" with the Culture A activated at the liquid state.

The surprising results found in the ensilages have directly reflect themselves on the sanitary state of lactation cattle fed with such ensilages.

After having administered the two typologies of ensilages for a remarkable period of time (about 30-40 days) in the animals fed with the "treated" cut, an improvement of the functional state of the mamma, shown above all by a sensitive decrease of the quarters with secretory disorders has been noted.

Analysis carried out on samples of mass milks have pointed out, with reference to the number of clostridia spores in the milk, the data reported below in the Table V expressed in groups of classes of merit with the respective percentages:

Table V

Number of spores of butyric clostridia per litre of milk (MPN / l)	Milk coming from farms in which the cattle have been fed with ensilages "treated" with Culture A	Milk coming from farms in which the cattle have been fed with "non-treated" ensilages
less than 250	70 %	-
from 251 to 750	20 %	40 %
from 751 to 2,500	10 %	30 %
over 2,500	-	30 %

EXAMPLE 3

EVALUATION OF THE EFFECT OF THE TEMPERATURE-ACIDITY
COMBINATION ON CLOSTRIDIA AND PROPIONICS IN THE PREPA-
RATION OF THE PROVOLONE CHEESE

The thermal cycle which characterizes the Provolone paste has been simulated; half of the milk samples has been acidified with the processing serum-graft and the other half has not been inoculated; next, they have been incubated for 7 hours at the temperatures of 52-54°C, selected after having ascertained that the mean cooking temperature used for this cheese is of about 50°C.

The incubation of the same samples have then been continued with a thermal gradient descending of 1°C per hour, over a total time of 48 hours.

Withdrawals carried out at time zero (corresponding with the moment of the end of the curd discharge in the draining basin), after 2 hours (time corresponding with 2 hours of paste ripening) and at 4 hours/time corresponding with the beginning of the paste spinning) have been subjected with a great accuracy to the determination of the spores number and the vegetative cells.

The Table VI below diagrammatically summarizes the most important detections which have resulted from the

several determinations tested *in vitro*:

Table VI

<i>Incubation temperature</i>	<i>50° C</i>			<i>52° C</i>		
<i>Time in hours of the sampling</i>	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>4</i>
Mean germination percentage of the spores in milk inoculated with serum-graft	0	~19	~37	0	~44	~86
% of knocking-down of the vegetative cells in milk inoculated with serum-graft for the combined temperature-pH action	0	~26	~53	0	~51	~91

From the data reported in the experimental part, it emerges that the temperature has a determining role in the spores germination, replication rate of the vegetative forms and in their destruction, above all if associated with high acidity.

Testes carried out in caseations of Provolone cheese have confirmed the laboratory data, pointing out that only about 7-8% of the spores existing in the milk are retained in the curd, whereas the 92-93% are fortunately lost in the curd.

Considering that in the medium and long seasoning-cheeses the defect of late swelling is manifested also

when the milk to be caseated has a very low number of spores (about 40 per litre) and vegetative cells (a few hundreds per litre), and that the processing technological conditions induce a sensitive decrease of the same, it has to be concluded that it is however a matter of numbers, even if very low, and therefore it is necessary to adopt the processing parameters capable of promoting at most the germination of the spores and, on the other side, destroying the vegetative forms already existing in the milk, or generated after the breaking of the spore wall.

It can be pointed out that most of the whole Provolone cheeses which manifest the swelling defect also after a month from the production are characterized by a few tens of points which show eyelet, tears or slots, distribute in the surface of the dissected cheese, with a particular thickening in the centre.

These points, indeed, are nothing but the zones in which, over time, colonies of clostridia deriving from the few individuals, which remain in the cheese and which constitute some centres or cores where, when the conditions of the cheese paste, such as pH, redox potential, temperature, anaerobiosis conditions, etc. become compatible with the development and the butyrics multiplications, a gradual accumulation of

their catabolites occurs, including the hydrogen and the carbon dioxide, which are a cause of the butyric swelling, have been formed.

It has then to be understood that, in order to avoid the defect of late swelling due to clostridia, without having to make use of additives, it is necessary to dramatically reduce in the whole cheese their number, which would not seem alarming per sé, by exploiting the particular physical-chemical conditions which can naturally be established within the first hours of life of the cheese itself.

This specific aspect of the method subject of the present invention is to adopt a cooking temperature of the curd higher than the current state of the art, by choosing the one which represents the best combination between the ability of inducing the maximum germination of the spores and the possibility of subsequently determining the highest knocking-down of the vegetative forms due to the temperature-pH combination which has established in the cheese paste.

The following Table VII shows the results obtainable with the same milk contaminated by about 400 spores and 10,000 vegetative cells per litre.

Table VII

Clostridia per kg of paste for Provolone cheese before the spinning	Cooking at 50°C	Cooking at 52°C
Spores	~ 180	~ 33
Vegetative cells	~ 980,000	~ 180,000

EXAMPLE 4

DETERMINATION OF THE TEMPERATURE VALUES IN THE MIDDLE OF THE PROVOLONE CHEESE OF DIFFERENT SIZES IN WATER AT THE TEMPERATURE OF +5.7°C IN A RECIRCULATING WAY

In the Table VIII, the temperatures verified in Provolone cheeses with respect to the time are reported.

Table VIII

Hours from the forming	14 kg cheese	24 kg cheese
	<i>Temperature °C</i>	
0	55	55
3	36.0	42.8
6	24.2	30.2
9	16.0	21.3
12	10.8	16.0
18	7.5	11.1

By analyzing the heat course, it results apparent that in order to reduce at minimum the metabolic and therefore replication activity of the clostridia cells and the propionics, it is important to accelerate at most

the cooling, for reaching temperatures lower than 10-12°C.

EXAMPLE 5

DETERMINATION OF THE FREE FAT ACIDS IN SAMPLES OF PROVOLONE CHEESE

In the following Tables IX to XIV below, the results of caseation experiments for the Provolone cheese, carried out according to the traditional methods and according to the inventive method, are reported.

The quantities of butyric and propionic acids are shown in mg of acid per 100 g of dry substance, if not shown otherwise.

i) Caseation without pre-treatment of the ensilages and with cooling treatment post-traditional forming.

Table IX

Reference	Seasoning	Serum-graft/ additives	Propionic acid	Butyric acid
#464	1 month ⁽¹⁾	Cheese factory/ Absent	17.40	182.84
#463	1 month ⁽²⁾	Culture A/absent	4.17	78.49

⁽¹⁾ broken cheeses

⁽²⁾ scales, small eyelets

ii) Caseation without pre-treatment of the ensilages and with post-forming cooling treatment according to the invention.

Table X

Reference	Seasoning	Serum-graft/ additives	Propionic acid	Butyric acid
#591	4 months	Cheese factory/ hexamine	5.36	5.14
#592	4 months	Culture A/absent	5.57	5.21

Table XI

Reference	Seasoning	Serum-graft/ additives	Propionic acid	Butyric acid
#383	3 months	Cheese factory/ hexamine	1.34	14.37
#385	3 months	Culture A/absent	1.16	9.49

Table XII

Ref.	Seasoning	Serum-graft/ additives	Propionic acid	Butyric acid	Ripening index
#1	4 months	Cheese factory/ Hexamine	5.36	5.14	17.81
#2	4 months	Culture A/absent	5.57	5.21	19.34

iii) Caseation with treatment of the ensilages according to the invention and post-forming cooling treatment according to the invention.

Table XIII

Reference	Seasoning	Serum-graft/ additives	Propionic acid	Butyric acid
#488	1 month ⁽¹⁾	Cheese factory/ Absent	8.32	56.15
#489	1 month	Culture A/absent	0.64	2.18

(1) swollen cheeses with breakages

Table XIV

Ref.	Seasoning	Serum-graft/ additives	Propionic acid	Butyric acid	Ripening index
#1	4 months	Cheese factory/ Hexamine	1.81	3.49	17.02
#2	4 months	Culture A/absent	1.24	3.37	19.36 ⁽¹⁾

(1) the difference detected with the analysis (2.34 points) does not reflect the objective reality, as the organoleptic examination points out well greater ripening differences for the cheese produced with the culture A without preservatives.

CLAIMS

1. Method for avoiding and/or reducing the butyric swelling and/or the propionic fermentation caused by clostridia and propionic bacteria in cheeses which includes to carry out at least one of the following (a) or (b) steps:

(a) treating, at the time of their ensilage, the forage essence intended for the feeding of the dairy cattle with a suspension of reactivated cultures of facultative hetero-fermenting lactobacilli in an aqueous culture medium, in an extent of at least $1 \cdot 10^5$ lactobacilli per gram of forage essence;

(b) in the preparation process of the cheese, increase the cooking temperature of the curd of 2-4°C with respect to the usual temperatures foreseen, by using at the same time natural serum-grafts subjected to thermal induction.

2. Method according to claim 1, characterized in that in the step (a) said suspension is used in an extent of at least $1 \cdot 10^6$ lactobacilli per gram of forage essence.

3. Method according to claims 1 or 2, characterized in that it further includes the cooling of the cheese after the forming, by dipping in water at a temperature not higher than 9°C until the temperature in the

core of the cheese decreases at a value lower than about 10-12°C.

4. Method according to claims 1 to 3, characterized in that in the step (a) said lactobacilli are autochthons of said forage essence.

5. Method according to claims 1 to 4, characterized in that in the step (a) said forage essence is the waxy maize and said lactobacilli include the *Lactobacillus plantarum* and/or the *Lactobacillus pentosus*.

6. Method according to claim 5, characterized in that said lactobacilli are selected in the group consisting of *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, *Lactobacillus plantarum* LMG P-21021, *Lactobacillus plantarum* LMG P-21022, *Lactobacillus plantarum* LMG P-21023, *Lactobacillus pentosus* LMG P-21019 and their mixtures.

7. Method according to claims 1 to 6, characterized in that in the step (a) said culture medium includes nutritive elements for said lactobacilli and a buffer system.

8. Method according to claim 7, characterized in that said buffer system is a sodium monohydrogenphosphate/potassium dihydrogenphosphate system.

9. Method according to claim 7, characterized in that in the step (b) said cooking temperature of the curd is 50-53°C for cheeses with a spun paste and 54-56°C

for cheeses with a hard paste.

10. Method according to claims 1, 3 or 9, characterized in that said natural serum-grafts are autochthons of each dairy factory.

11. Method according to claims 1, 3 or 9, characterized in that said thermal induction is carried out until a complete adaptation of the natural serum-grafts at said temperatures.

12. Method according to any one of the preceding claims, which includes to sequentially carry out both the steps (a) and (b).

13. Method according to claim 12, which further includes the cooling of the cheese, after the forming, by dipping in water at a temperature not higher than 9°C until the temperature in the core of the cheese decreases at a value lower than about 10-12°C.

14. Method according to claims 3 or 13, characterized in that said cooling is carried out in water at a temperature of 3-7°C.

15. Method according to claim 14, characterized in that said cooling is carried out in dynamic systems with a cold water recirculation.

16. Method according to any one of the preceding claims, for the making of medium and long seasoning-cheeses free of additives.

17. Method according to any one of the preceding claims, for the making of Provolone, Grana Padano, Montasio and Asiago cheeses.

18. Medium and long seasoning-cheese free of additives obtained with the method according to the claims 1 to 17.

19. Lactobacillus selected from the group consisting of Lactobacillus plantarum LMG P-21020, Lactobacillus plantarum LMG P-21021, Lactobacillus plantarum LMG P-21022, Lactobacillus plantarum LMG P-21023, Lactobacillus pentosus LMG P-21019 and their mixtures.

20. Use of at least a Lactobacillus of claim 19 for the treatment of the forage essences intended for the feeding of the dairy cattle.

21. Use of natural serum-grafts subjected to thermal induction for carrying out caseations carried out without the use of additives.

22. Use according to claim 21, wherein said natural serum-grafts come from serums of autochthonous caseations'end of each dairy factory and specific for the single cheeses for which they are used.

ABSTRACT

The invention relates to a method for avoiding and/or reducing the butyric swelling and/or the propionic fermentation caused by clostridia and propionic bacteria in cheeses, in particular in medium and long seasoning-cheeses, which includes to carry out the treatment of the forage essence intended for the feeding of the dairy cattle with a suspension of reactivated cultures of facultative heterofermenting lactobacilli in an aqueous culture medium or, alternatively or rather sequentially, in the preparation process of the cheese and to increase the cooking temperature of the curd by using at the same time natural serum-grafts subjected to thermal induction.